

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Implication du glutamate et de l'oxyde nitrique dans la  
modulation de la dépression synaptique à court terme à  
la jonction neuromusculaire de *Rana pipiens*.

Par  
Audrée Pinard

Département de physiologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de *philosophæ doctor*  
En sciences neurologiques

Janvier 2008

© Audrée Pinard, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse est intitulée

Implication du glutamate et de l'oxyde nitrique dans la  
modulation de la dépression synaptique à court terme à  
la jonction neuromusculaire de *Rana pipiens*.

Présentée par :  
Audrée Pinard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Arlette Kolta, président-rapporteur

Richard Robitaille, directeur de recherche

Jean-Claude Lacaille, membre du jury

Clark Lindgren, examinateur externe

Et un représentant du doyen de la FES



## **RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS**

Lorsque l'on pense à la transmission neuromusculaire, on la perçoit généralement comme une forme simplifiée de la neurotransmission centrale. En effet, dans le système nerveux central, un seul neurone reçoit des inputs d'un nombre parfois très élevé de neurones et doit faire l'intégration de cette multitude d'inputs afin de produire une réponse cohérente. La JNM, pour sa part, par sa simplicité, a longtemps été décrite comme une structure relativement élémentaire où les éléments postsynaptiques reçoivent des inputs d'un neurone unique ne libérant qu'un neurotransmetteur, l'acétylcholine, lequel active uniquement un type de récepteur spécifique, les récepteurs nicotiniques. Au cours des dernières années, plusieurs études ont cependant démontré la présence d'éléments impliqués dans la neurotransmission glutamatergique. En effet, la présence du glutamate, de ses récepteurs et transporteurs a été démontrée. Ainsi, les études présentées dans cette thèse visaient premièrement à démontrer la fonctionnalité de cette machinerie glutamatergique et son implication dans la modulation de la transmission et la plasticité synaptique à la JNM. Les résultats obtenus confirment l'implication du glutamate comme neuromodulateur agissant sur la terminaison présynaptique en induisant une diminution de la libération de neurotransmetteur et en contribuant à la modulation à la baisse la dépression synaptique. Les résultats obtenus démontrent aussi que l'effet du glutamate passe par l'activation de récepteurs de type métabotropes localisés sur les fibres musculaires. Ces résultats, à prime abord contradictoires quant à l'effet du glutamate et la position de ses récepteurs à la synapse, ont cependant été réconciliés par la démonstration d'une contribution nitriergique à la modulation glutamatergique. En effet, la contribution de l'oxyde nitrique à la transmission et la dépression synaptique est en tout point comparable aux effets synaptiques observés du glutamate. Ainsi, l'hypothèse d'une modulation glutamatergique nitriergique dépendante a été testée à la JNM. Les résultats obtenus dans la seconde portion de cette thèse concordent parfaitement avec l'hypothèse posée et démontrent que l'oxyde nitrique, en agissant comme messenger rétrograde, est responsable de l'effet présynaptique du glutamate. Finalement, les mécanismes impliqués dans la dépendance nitriergique de la modulation glutamatergique ont été évalués. Or, les résultats obtenus suggèrent que l'activation des récepteurs

métabotropes au glutamate permet, par un mécanisme dépendant du calcium musculaire, l'activation de la NOS et la production de NO. Ce NO est ainsi libre de diffuser à la terminaison présynaptique afin de traduire les effets du glutamate sur la transmission synaptique.

À la lumière de ces études, il apparaît donc que la jonction neuromusculaire, bien que considérée depuis de nombreuses années comme synapse purement cholinergique, posséderait une composante glutamatergique et nitrinergique capable de moduler finement son fonctionnement.

### ***MOTS CLÉS***

- 1- Synapse
- 2- Transmission synaptique
- 3- Plasticité synaptique
- 4- Dépression synaptique
- 5- Électrophysiologie
- 6- Glutamate
- 7- Récepteurs métabotropiques au glutamate
- 8- Oxyde nitrique
- 9- Oxyde nitrique synthase
- 10- Fibres musculaires

## ***ABSTRACT AND ENGLISH KEY WORDS***

When one thinks about neuromuscular transmission, one generally perceives it as a simplified version of central neurotransmission. In the central nervous system, a single neuron receives a large number of inputs from a myriad of different neurons and has to process those inputs in a unique and coherent synaptic response. Conversely, the singly innervated neuromuscular junction has long been described as a simple structure where the only transmitter released, acetylcholine, activates only one type of postsynaptic receptor, the nicotinic acetylcholine receptor. However, the past few years have been fruitful in demonstrations of a potential contribution of a second classic neurotransmitter in the modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction. Surprisingly, glutamate receptors and transporters, as well as glutamate itself, have been identified at this peripheral synapse. The primary focus of the first portion of this thesis was to demonstrate the functionality of this glutamatergic machinery and its involvement in the modulation of synaptic transmission and plasticity. The data obtained confirmed the contribution of glutamate as a presynaptic neuromodulator, decreasing the release of neurotransmitter and reducing synaptic depression. Moreover, the results showed that glutamate effects are mediated by muscular metabotropic glutamate receptor activation. These results, which are at first sight contradictory regarding the presynaptic effect of glutamate and the postsynaptic localization of its receptors, were reconciled by the demonstration of a nitrinergic contribution to glutamate effect. Indeed, nitric oxide contribution to synaptic transmission and depression is entirely equivalent to the effect of glutamate observed under the same experimental conditions. Consequently, the hypothesis of a nitrinergic dependent glutamatergic modulation was tested at the NMJ. The results obtained in this second portion of the thesis fit this hypothesis and showed that blockade of nitrinergic metabolism completely abolishes the effect of glutamate on the synapse. Nitric oxide works as a retrograde messenger responsible for the presynaptic effect of glutamate. Thirdly, the mechanisms involved in the dependency of glutamate modulation of nitric oxide were investigated in the last portion of this thesis. The results obtained suggest that metabotropic glutamate receptor activation allows, via a calcium-dependent

mechanism, the activation of the NO forming enzyme NO synthase located in the muscle fibres. NO is subsequently produced and diffuses to the presynaptic terminal where it affects transmitter release.

This study shed light on a fine modulation by glutamate and nitric oxide of neuromuscular transmission that has long been considered purely cholinergic.

### ***KEY WORDS***

- 1- Synapse
- 2- Synaptic transmission
- 3- Synaptic plasticity
- 4- Synaptic depression
- 5- Electrophysiology
- 6- Glutamate
- 7- Metabotropic glutamate receptors
- 8- Nitric oxide
- 9- Nitric oxide synthase
- 10- Muscle fibres

<b>1</b>	<b>CHAPITRE PREMIER</b>	<b>1</b>
1.1	PRÉAMBULE	1
1.2	LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE	4
1.2.1	<i>La synapse électrique</i>	5
1.2.2	<i>La synapse chimique</i>	6
1.2.2.1	Libération présynaptique	7
1.2.2.1.1	Libération vésiculaire de neurotransmetteurs	8
1.2.2.1	Transduction du message	17
1.2.2.1.1	Activation des récepteurs postsynaptiques	18
1.2.2.1.2	Activation des autorécepteurs	19
1.2.2.1.3	Activation des cellules gliales	20
1.2.2.1.4	Clairance des neurotransmetteurs	20
1.3	LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE	22
1.3.1	<i>Anatomie de la jonction neuromusculaire</i>	22
1.3.2	<i>Contraction musculaire</i>	26
1.3.3	<i>Approches pour l'Étude de la JNM</i>	27
1.4	NEUROTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE	30
1.4.1	<i>Le cycle du glutamate à la synapse</i>	30
1.4.2	<i>Récepteurs au glutamate</i>	33
1.4.2.1	Récepteurs ionotropiques	34
1.4.2.1.1	Récepteurs AMPA	34
1.4.2.1.2	Récepteurs Kainate	37
1.4.2.1.3	Récepteurs NMDA	38
1.4.2.2	Récepteurs métabotropes	40
1.4.2.2.1	Classes de récepteurs métabotropes au glutamate	41
1.4.2.2.1.1	Récepteurs métabotropes au glutamate de type I	42
1.4.2.2.1.2	Récepteurs métabotropes au glutamate de type II et III	43
1.4.2.2.2	Les cibles des mGluRs	43
1.4.2.2.2.1	Canaux calciques	44
1.4.2.2.2.2	Canaux potassiques	44
1.4.2.2.2.3	Récepteurs canaux AMPA, NMDA et kainate	45
1.4.2.2.2.4	Réserves calciques intracellulaires	46
1.4.2.2.3	Implication des mGluRs dans la transmission synaptique	47
1.4.2.2.4	Implication des mGluRs dans la plasticité synaptique	48
1.4.2.2.5	Modulation de l'activité des mGluRs	48
1.4.2.2.6	Régulation et interactions avec d'autres protéines	49
1.4.3	<i>Transporteurs au glutamate</i>	50
1.4.3.1	Transporteurs plasmiques	51
1.4.3.2	Transporteurs de basse affinité et indépendants du sodium	51
1.4.3.3	Transporteurs de haute affinité	52
1.4.3.3.1	Localisation des transporteurs de haute affinité	53
1.4.3.3.2	Structure des transporteurs de haute affinité	54
1.4.3.3.3	Modulation de l'activité des transporteurs de haute affinité	54
1.4.3.4	Transporteurs vésiculaires	55
1.4.3.4.1	Différences entre les isoformes VGLUT1, 2 et 3	56
1.4.3.4.2	Régulation des VGLUTs	57
1.4.3.4.3	Recyclage des VGLUTs	57
1.4.4	<i>Transmission glutamatergique à la JNM</i>	58
1.5	NEUROTRANSMISSION NITRINERGIQUE	60
1.5.1	<i>Biosynthèse du NO</i>	61
1.5.1.1	Biosynthèse dépendante de la NOS	61
1.5.1.1.1	Mécanismes de la synthèse NOS-dépendante de NO	61
1.5.1.1.2	Isoformes de NOS	63
1.5.1.1.2.1	La forme endothéliale (eNOS) (NOS3)	63
1.5.1.1.2.2	La forme inductible (macNOS) (NOS2) (iNOS)	64
1.5.1.1.2.3	La forme neuronale (nNOS) (NOS1)	65
1.5.1.1.3	Sites de régulation de la NOS	66
1.5.1.1.3.1	Modulation transcriptionnelle	66
1.5.1.1.3.2	Modulation de l'activité	67
1.5.1.1.3.3	Modulation de la localisation	68



1.5.1.2	Réserves S-Nitrosothiol .....	68
1.5.2	Mécanismes d'action du NO .....	69
1.5.2.1	la voie de la guanylate cyclase (GMPc-dépendant).....	69
1.5.2.2	Modifications post-traductionnelles (GMPc-indépendant) .....	71
1.5.3	Les effets du NO sur les neurones .....	72
1.5.3.1	Le rôle du NO sur la libération de neurotransmetteurs.....	72
1.5.3.2	Neurotoxicité nitrinergique .....	74
1.5.4	Liens entre la neurotransmission glutamatergique et nitrinergique. ....	76
1.5.5	Les cellules gliales : source régulée de NO .....	76
1.5.6	Le rôle du NO à la jonction neuromusculaire.....	78
1.5.7	Méthodes d'étude du métabolisme nitrinergique .....	81
1.6	PLASTICITÉ SYNAPTIQUE .....	82
1.6.1	Potentialisation synaptique à long terme (PLT) .....	82
1.6.2	Dépression synaptique à long terme (DLT) .....	84
1.6.3	Potentialisation synaptique à court terme.....	86
1.6.4	Dépression synaptique à court terme.....	87
1.6.4.1	Mécanismes présynaptiques.....	88
1.6.4.2	Mécanismes postsynaptiques.....	90
1.6.4.3	Inhibition par les récepteurs métabotropes présynaptiques .....	91
1.6.4.4	Autres mécanismes de la dépression.....	92
1.6.4.5	Implication des cellules gliales à la dépression synaptique.....	93
1.6.5	Plasticité à la jonction neuromusculaire.....	94
1.7	COTRANSMISSION.....	95
1.7.1	Cotransmission à la JNM.....	96
1.8	BUT DE LA THÈSE.....	98
1.8.1	Objectifs.....	98
2	ARTICLES DE RECHERCHE .....	100
2.1	PREMIER ARTICLE.....	100
2.1.1	Introduction du deuxième chapitre.....	101
2.1.2	Article du Deuxième chapitre.....	105
2.1.2.1	Summary .....	106
2.1.2.2	Introduction.....	107
2.1.2.3	Material and methods.....	108
2.1.2.4	Results.....	114
2.1.2.5	Discussion.....	124
2.1.2.6	Reference list .....	129
2.1.3	Discussion du deuxième chapitre.....	133
2.1.4	Conclusion du deuxième chapitre .....	134
2.2	DEUXIÈME ARTICLE.....	135
2.2.1	Introduction du troisième chapitre.....	136
2.2.2	Article du troisième chapitre.....	139
2.2.2.1	Summary .....	140
2.2.2.2	Introduction.....	141
2.2.2.3	Material and Methods .....	142
2.2.2.4	Results.....	146
2.2.2.5	Discussion.....	159
2.2.2.6	Reference list .....	166
2.2.3	Discussion du troisième chapitre .....	169
2.2.4	Conclusion du troisième chapitre .....	170
3	DISCUSSION GÉNÉRALE .....	171
3.1	COTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE À LA JNM?.....	172
3.1.1	Glutamate à la JNM : rôle fonctionnel ou vestige évolutif?.....	173
3.1.2	Glutamate : Neurotransmetteur ou neuromodulateur?.....	174
3.2	LE NO COMME MODULATEUR ENDOGÈNE À LA JNM.....	176
3.2.1	Mécanismes probables d'action du NO sur la terminaison.....	177
3.3	COOPÉRATION DU NO ET DU GLUTAMATE SUR L'EFFICACITÉ SYNAPTIQUE. ....	178

3.3.1	<i>Pourquoi l'effet du glutamate passe-t-il par la production du NO?</i>	180
3.4	LA FIBRE MUSCULAIRE COMME PARTENAIRE ACTIF À LA JNM	181
3.5	PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LA JNM	184
3.5.1	<i>Plasticité à court terme</i>	184
3.5.2	<i>La plasticité à long terme</i>	186
3.6	LA CONTRIBUTION DES CELLULES GLIALES	186
3.6.1	<i>Le rôle des cellules gliales dans le système nerveux central</i>	187
3.6.2	<i>Rôle des cellules de Schwann périssynaptiques à la JNM</i>	188
3.6.3	<i>Modulateurs gliaux potentiels</i>	189
3.6.3.1	Modulateur gliaux dépresseurs	189
3.6.3.1.1	Le glutamate	189
3.6.3.1.2	L'oxyde nitrique	190
3.6.3.2	Modulateur gliaux potentialisateurs	191
3.6.3.2.1	Les prostaglandines	191
3.6.4	<i>Modulation gliale de la plasticité à la JNM</i>	192
3.7	MODÈLE REVISITÉ DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE À LA JNM DE GRENOUILLE	193
3.7.1	<i>Stimulations à hautes fréquences de la JNM</i>	194
3.7.2	<i>Stimulation à basses fréquences de la JNM</i>	196
4	<b>PERSPECTIVES FUTURES ET CONCLUSIONS</b>	198
4.1	PERSPECTIVES FUTURES	198
4.2	CONCLUSIONS	202
5	<b>BIBLIOGRAPHIE DE LA THÈSE</b>	204

***LISTE DES TABLEAUX*****TABLEAU DU PREMIER CHAPITRE**

Tableau 1	Résumé des différentes classes de récepteurs au glutamate.....	33
-----------	--	----

## LISTE DES FIGURES

### FIGURES DE L'INTRODUCTION

Figure 1	Diagramme représentant les étapes de la transmission synaptique .....	7
Figure 2	Synthèse des neurotransmetteurs à petites molécules .....	9
Figure 3	Synthèse des neuropeptides .....	10
Figure 4	Schéma des protéines impliquées dans l'exocytose .....	12
Figure 5	Diagramme de la jonction neuromusculaire .....	24
Figure 6	Cycle du glutamate .....	32
Figure 7	Les cibles du NO .....	71

### FIGURES DU PREMIER CHAPITRE

Figure 1.	Exogenous glutamate decreases transmitter release.....	115
Figure 2.	Glutamate does not affect Ca <sup>2+</sup> entry in nerve terminals.....	117
Figure 3.	mGluR receptors are involved in glutamate effect.....	118
Figure 4.	Localization of mGluRs at the NMJ.....	120
Figure 5.	Functional glutamatergic uptake machinery at the amphibian NMJ...1211	
Figure 6.	The glutamate transporter GLAST is present at the amphibian NMJ.1233	
Figure 7.	Large glutamate concentrations are required to induce Ca <sup>2+</sup> .....1244 responses in PSCs.	

### FIGURES DU DEUXIÈME CHAPITRE

Figure 1	Glutamate effects are NO-dependent.....	147
Figure 2	Glutamate modulation depends on NO.....	149
Figure 3	Postsynaptic calcium modulates the glutamate effect .....	153
Figure 4	mGluR dependent production of NO.....	155
Figure 5	Endogenous glutamate stimulates NO production through mGluRs.....	157
Figure 6	Muscular calcium chelator blocks NO production .....	158
Figure 7	Model of the glutamatergic modulation at the frog NMJ .....	1655

### FIGURE DE LA DISCUSSION GÉNÉRALE

Figure 8	Résumé de la transmission neuromusculaire.....	19465
----------	--	-------

## **LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

ACh :	Acétycholine
AChE :	Acétycholine estérase
AChR :	Récepteur à l'acétycholine
AMPA :	Acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionique
AP3 :	Brefeldin A (BFA)-sensitive adaptor
ATP :	Adénosine triphosphate
BAPTA :	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N'N'N'N'-tetraacetic acid
Ca <sup>2+</sup> :	Calcium
CaMKII :	Calcium/calmoduline kinase II
CICR :	Calcium induced calcium release
DHPR :	Récepteur aux dihydropyridines
DLT :	Dépression à long terme
GC :	Guanylate cyclase
GLAST :	Glutamate-aspartate transporteur
GLT :	Glutamate transporteur
GMPc :	Guanosine mono-phosphate cyclique
IP <sub>3</sub> :	Inositol-1,4,5-triphosphate
JNM :	Jonction neuromusculaire
mGluR :	Récepteur metabotrope au glutamate
NMDA :	N-methyl-D-aspartate
NO :	Oxyde nitrique
NOS :	Oxyde nitrique synthase
PDE :	Phosphodiesterase
PKA :	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC :	Protéine kinase C
PLT :	Potentialisation à long terme
PPM :	Potentiel de plaque motrice
PPMm :	Potentiel de plaque motrice miniature
CSPs :	Cellules de Schwann périssynaptiques
RRP :	Vésicules à libération immédiate
RyR :	Récepteur à la ryanodine
SNARE :	Soluble NSF-attachment protein
SNC :	Système nerveux central
SNP :	Système nerveux périphérique
VAMP :	Vesicular-associated membrane protein
VGLUT :	Transporteur vésiculaire au glutamate

***LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS EN ANGLAIS***

$\alpha$ -BuTx :	Alpha-bungarotoxin
ACPD:	(1S,3R)-aminocyclopentanedicarboxylic acid
CNQX :	6-cyano-7 nitroquinoxaline-2,3-dione
DAF-FM:	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate
EPP:	End plate potential
MCPG:	(S)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine
MEPP :	Miniature end plate potential
nAChR :	Nicotinic acetylcholine receptor
NMJ:	Neuromuscular junction
NO:	Nitric oxide
NOS:	Nitric oxide synthase
PSCs:	Perisynaptic Schwann cells
SNAP:	S-Nitroso-N-acetylpenicillamine

# **1 CHAPITRE PREMIER**

## **1.1 PRÉAMBULE**

L'intérêt premier des neurosciences est de comprendre les mécanismes par lesquels l'humain est capable d'interpréter le monde qui l'entoure et de produire des réponses adéquates aux changements de son environnement. Les domaines d'études au sein de cette discipline s'étalent de l'étude des comportements à l'identification de mécanismes moléculaires impliqués dans les phénomènes aussi variés que la mémoire, l'apprentissage, le mouvement et la perception. Afin d'apprécier la complexité du cerveau, il est essentiel de comprendre les mécanismes de bases de son fonctionnement ainsi que son organisation anatomique.

Le système nerveux est composé de milliards de cellules spécialisées, les neurones, qui communiquent entre elles par l'intermédiaire de réseaux complexes. Le neurone est constitué d'un corps cellulaire contenant l'information génétique, des prolongements dendritiques et de l'axone, structure spécialisée dans la conduction à haute vitesse. Par ailleurs, l'extrémité de l'axone se ramifie finalement pour former les terminaisons présynaptiques. Ces terminaisons servent de lieu de transfert de l'influx nerveux d'un neurone à un autre par une structure hautement complexe, la synapse. Le neurone récepteur, nommé neurone postsynaptique, reçoit l'information sous forme de neurotransmetteur, au niveau des dendrites (bien que la synapse peut aussi se faire au niveau des corps cellulaire). Toutefois, à la jonction neuromusculaire (JNM), la cellule faisant office d'élément postsynaptique n'est pas un neurone mais une fibre musculaire.

Classiquement, on considérait que la terminaison présynaptique ne libérait qu'un seul neurotransmetteur lequel agissait sur les récepteurs postsynaptiques. Toutefois, ce concept est aujourd'hui remis en question par des démonstrations dans le SNC et le SNP de la présence de plusieurs neurotransmetteurs agissant à une même synapse. C'est notamment le cas de la JNM, ayant longtemps été considérée

comme purement cholinergique. En effet, les données s'accumulent pour démontrer la présence de d'autres agents neuroactifs capables de moduler la transmission synaptique.

L'une des propriétés essentielles des synapses est leur capacité de réguler la force de leurs connexions en fonction de leur activité antérieure. En effet, la plasticité synaptique est un phénomène physiologique qui permet d'augmenter ou diminuer, à plus ou moins long-terme, l'efficacité de la transmission synaptique entre deux cellules neuronales, ou neuronale et musculaire dans le cas de la JNM. Ce phénomène a été associé au niveau central, notamment dans l'hippocampe, aux mécanismes cellulaires à la base de la mémoire. L'intérêt attribué à l'étude des mécanismes, physiologiques, moléculaires et génétiques impliqués dans la plasticité synaptique et sa modulation est donc d'une portée capitale en neuroscience.

La description de la transmission synaptique étalée dans les derniers paragraphes représente toutefois une version simplifiée de la réalité. En effet, un troisième partenaire synaptique est présent à la synapse. Les cellules gliales pérисynaptiques ont longtemps été uniquement considérées, à tort, comme des cellules passives, nourricières et protectrices des neurones. Toutefois, un nombre croissant d'études démontre désormais un rôle plus actif des cellules gliales dans le transit de l'information nerveuse. On reconnaît maintenant que les cellules gliales sont sensibles à l'activité neuronale et y répondent notamment en libérant des gliotransmetteurs dont l'action sur les neurones et la transmission synaptique est irréfutable.

Le résultat final de la transmission de l'influx nerveux d'une cellule présynaptique à son partenaire postsynaptique est donc le reflet des propriétés intrinsèques de la synapse, des agents régulateurs agissant sur elle, de son historique de décharge ainsi que de son environnement dont font notamment partie les cellules gliales. Ainsi, afin de permettre l'étude adéquate d'une synapse, de ses composantes et ses propriétés dans un contexte physiologique, l'utilisation d'un bon



modèle d'étude est primordiale. La JNM est parfaitement attitrée comme modèle d'étude de la transmission synaptique. En effet, c'est l'une des synapses les mieux caractérisées et les descriptions anatomiques, physiologiques, génétiques et moléculaires sont très riches. De plus, la JNM démontre plusieurs formes de plasticité synaptique, notamment la dépression à court terme phénomène de plasticité dominant à la JNM.

La JNM a donc été mise à profit dans cette thèse afin de répondre à la question suivante, c'est-à-dire : Quels sont les neuromodulateurs et mécanismes impliqués dans la modulation de la dépression synaptique à court terme à la JNM?

## 1.2 LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE

La transmission synaptique est le processus par lequel les milliards de neurones d'un système nerveux communiquent entre eux au travers de la synapse. L'efficacité, la rapidité et la précision avec lesquelles cette myriade de neurones transmet l'information au sein d'un réseau si complexe que le SNC sont les qualités essentielles respectées parmi toutes les connexions neuronales. L'importance de cette fiabilité de la transmission synaptique est notamment appréciable par l'observation des désordres affectant l'une ou l'autre de ces caractéristiques et qui ont comme conséquences d'affecter dramatiquement l'intégrité de la physiologie neuronale (Rich, 2006). Malgré la complexité des fonctions associées au SNC, la transmission synaptique se fait toujours par l'intermédiaire de deux formes de transmission de base soit la transmission électrique et la transmission chimique. Suite aux premières descriptions du tissu nerveux, toutes les synapses étaient considérées électriques et la doctrine, élaborée à la base par Eccles et Sherrington, stipulait que le potentiel d'action généré dans le neurone présynaptique génèrerait assez de courant pour diffuser passivement à la cellule postsynaptique (Eccles et Sherrington, 1930). La seconde école de pensée, menée principalement par Dale argumentait, pour sa part, que la transmission était plutôt de nature chimique. De nos jours, il est reconnu que les deux modes de transmission co-existent. La venue des techniques d'enregistrement physiologiques et de la microscopie électronique ont permis de distinguer les caractéristiques et morphologies spécifiques à ces deux types de synapses. Les mécanismes de base impliqués dans ces modes de transmission sont généralement stéréotypés, bien qu'il existe toutefois des différences importantes entre les différentes populations neuronales lesquelles sont responsables de la richesse et la complexité du SNC. Les prochaines sections seront orientées à la description de ces deux modes de transmission synaptique.

## LA SYNAPSE ÉLECTRIQUE

La propriété principale des synapses électriques est leur capacité de produire un signal électrique qui se propage instantanément, c'est-à-dire sans délai synaptique. Cette propriété est notamment due à la présence d'un continuum entre les cytoplasmes des cellules pré et postsynaptiques. La présence d'une synapse électrique entre deux neurones est généralement corrélée avec la présence de jonctions Gap. Les jonctions Gap sont des structures spécialisées dans la conduction bidirectionnelle des courants ioniques entre les deux cellules qu'elles apposent. Les canaux des jonctions Gap sont formés de protéines connexines lesquelles forment un pore aux régions où les membranes sont apposées (à 3.5nm de distance) formant un pont entre les cytoplasmes des cellules (Evans et Martin, 2002). L'agglomération des connexines en hexamère forme un héli-canal nommé connexon qui à son tour s'associe avec un autre connexon pour former un canal fonctionnel. Le diamètre du canal (1.5nm) ainsi formé permet le passage d'ions et de certains métabolites d'une cellule à l'autre. Il existe plusieurs isoformes de connexines, nommées selon leur poids moléculaire et qui forment des connexons homo ou hétérodimériques (Teubner et al., 2000; Willecke et al., 2002). Cette diversité moléculaire est responsable de la variabilité des facteurs modulateurs influençant les propriétés d'ouverture et de fermeture du canal. Ces facteurs modulateurs sont entre autre le pH cellulaire, les neurotransmetteurs ainsi que le niveau de calcium.

La dépolarisation du neurone présynaptique au dessus du seuil d'émission du potentiel d'action induit par l'ouverture des canaux ioniques, doit générer suffisamment de courant pour produire une modification du potentiel du neurone postsynaptique. Cette condition est habituellement remplie lorsque le neurone présynaptique contient une quantité élevée de canaux ioniques et que le neurone postsynaptique est suffisamment petit pour que la dépolarisation soit importante. L'une des caractéristiques de ce mode de transmission est la rapidité avec laquelle la dépolarisation est transmise d'un neurone à l'autre. De plus, les synapses électriques permettent de connecter entre eux un large groupe de neurones leur permettant

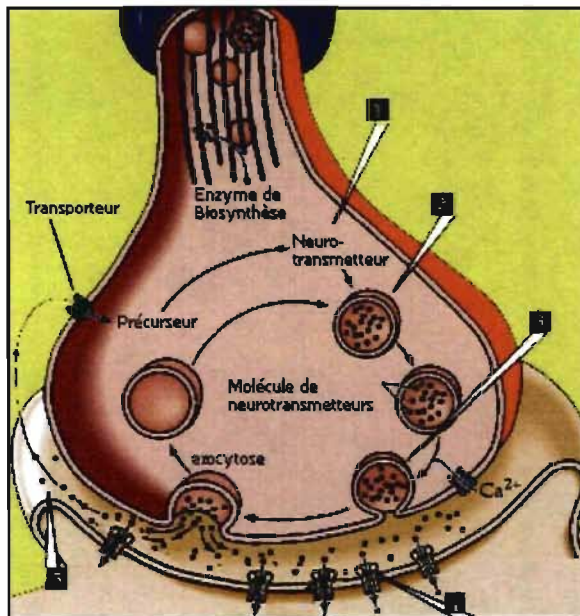
d'agir de manière coordonnée. Malgré l'importance et les avantages physiologiques associés à la synapse électrique dans le SNC, l'on dénombre une quantité supérieure d'études portant sur la caractérisation et les fonctions de la synapse chimique.

## LA SYNAPSE CHIMIQUE

La première démonstration d'une composante chimique à la transmission fut décrite par Otto Lewis dans les années 1920. Ce dernier démontra qu'une molécule chimique, provenant du nerf vague est responsable de la contraction du muscle cardiaque. Cette observation fit son chemin si bien qu'après plusieurs années, l'école de pensée pharmacologique menée principalement par Henry Dale stipulait que le passage du potentiel d'action d'un neurone à l'autre se fait par la libération d'une substance chimique. Cette molécule initierait l'activation de conductances ioniques dans le neurone postsynaptique. Contrairement à la synapse électrique, il n'existe pas de continuité entre les neurones pré et postsynaptique. La région séparant les neurones, nommée fente synaptique, est d'une largeur de 20 à 40 nm et est la région par laquelle transitent les neurotransmetteurs libérés par la terminaison présynaptique. L'activation des récepteurs présents sur le neurone postsynaptique provoque des changements des conductances ioniques modifiant ainsi le potentiel de la cellule. Si cette dépolarisation est suffisante, un potentiel d'action sera déclenché. L'importance d'une bonne gestion des mécanismes impliqués dans la libération des neurotransmetteurs est mise en évidence par la multitude de mécanismes de régulation agissant à la synapse. Ces mécanismes de régulation agissent à toutes les étapes de la vie du neurotransmetteur soit de sa synthèse en passant par sa libération jusqu'à son action finale et sa dégradation. L'un des avantages de la synapse chimique est la diversité d'action générée par la présence de plusieurs classes de neurotransmetteurs et récepteurs. Ceux-ci permettent l'expression d'un large éventail d'action dont les cinétiques et mécanismes de modulation varient. De plus, les synapses chimiques permettent l'inhibition. En effet, l'activation des récepteurs peut aussi mener à la diminution de l'excitabilité neuronale ce qui n'est pas le cas avec la synapse électrique laquelle est toujours excitatrice.

Les prochaines sections traiteront ainsi des différentes étapes de la neurotransmission et de leur mode de régulation. Les différentes étapes de la libération de neurotransmetteurs sont résumées à l'aide de la **figure 1**.

**Figure 1 Diagramme représentant les étapes de la transmission synaptique**



- 1) Les neurotransmetteurs sont synthétisés dans les terminaisons ou dans le corps cellulaire.
- 2) Les neurotransmetteurs sont transportés dans les vésicules synaptiques.
- 3) Les neurotransmetteurs sont libérés dans la fente synaptique suite à la fusion des vésicules avec la membrane plasmique.
- 4) Les neurotransmetteurs activent les récepteurs postsynaptiques.
- 5) Les neurotransmetteurs diffusent hors de la fente synaptique où ils sont retransportés dans la terminaison présynaptique ou métabolisés par des enzymes de dégradation.

Tiré de Purves et al, 1999, Neurosciences. DeBoeck Université, Paris, Bruxelles, 602 pages.

#### 1.2.2.1 LIBÉRATION PRÉSYPNAPTIQUE

Les premières étapes de la neurotransmission se déroulent dans le neurone présynaptique et sont responsables de la libération régulée de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. L'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison synaptique permet la relâche d'une quantité de neurotransmetteurs dépendant de l'amplitude de ce dernier. Les étapes présynaptiques essentielles au transit des neurotransmetteurs, de leur synthèse à leur libération dans la fente synaptique, seront décrites dans les prochaines sections.

### 1.2.2.1.1 Libération vésiculaire de neurotransmetteurs

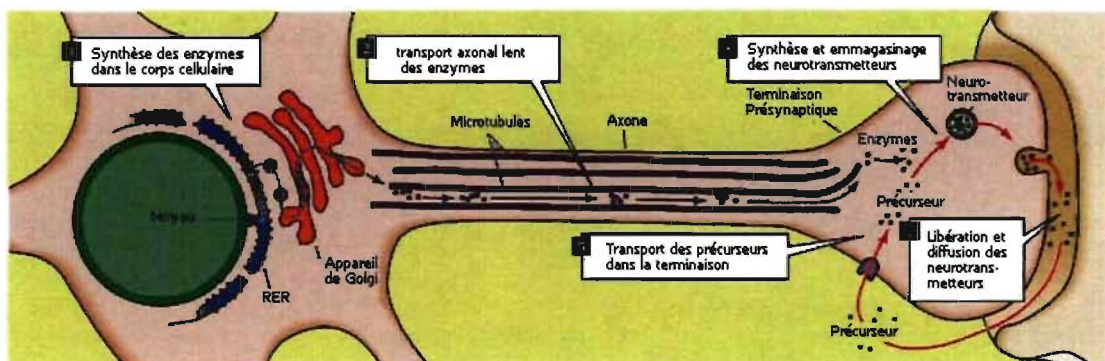
La première étape de la neurotransmission est marquée par l'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison présynaptique permettant la libération d'une quantité de neurotransmetteurs dans la fente synaptique variant proportionnellement avec l'amplitude de la dépolarisation causée par le potentiel d'action. Toutefois, l'amplitude des événements postsynaptiques enregistrés varie par sauts dont l'amplitude est constante. En effet, au cours de leurs expériences pionnières, Katz et collaborateurs ont démontré que la libération de neurotransmetteurs se faisait toujours en paquets (quanta) (Fatt et Katz, 1951). En abaissant suffisamment la concentration de calcium afin de réduire la probabilité de relâche, ils remarquèrent que les événements observés avaient des amplitudes variant en échelon (quanta) selon un multiple constant. Ils en conclurent que la transmission synaptique était le résultat de l'addition de ces événements unitaires et que les neurotransmetteurs devaient être libérés par paquets. Ces études innovatrices ont menées à l'élaboration du concept maintenant accepté de la libération quantique de neurotransmetteurs. Avec la venue de techniques plus précises, notamment de la microscopie électronique, la présence des vésicules synaptiques, comme unité fonctionnelle permettant l'emballage de neurotransmetteurs, fut mise à jour supportant ainsi la théorie de libération quantique. Selon ce modèle, la transmission synaptique dépend donc de la capacité des neurones à stocker les neurotransmetteurs, suite à leur synthèse, dans des vésicules synaptiques. De plus, les neurones doivent mettre au point des systèmes permettant non seulement la libération de ces vésicules et leur contenu dans la fente synaptique mais aussi permettant le recyclage efficace de ces vésicules pour des cycles de libération subséquents. Les prochaines sections feront la description des étapes impliquées dans la vie d'une vésicule et des neurotransmetteurs qu'elle contient.

### 1.2.2.1.1. Synthèse et empaquetage des neurotransmetteurs dans les vésicules

Les voies de synthèse des neurotransmetteurs sont différentes pour chaque type de molécule neuroactive, bien que des grandes lignes puissent être tirées. La synthèse des neurotransmetteurs à petites molécules (ACh, les acides aminés, les purines, les catécholamines, sérotonine et histamine), comme illustré à la **figure 2** se fait localement dans les terminaisons à l'aide d'enzymes importées par transport axonal lent à partir du corps cellulaire (Hirokawa, 1993). Les molécules utilisées pour leur synthèse proviennent pour leur part de transporteurs localisés dans les terminaisons. Les neurotransmetteurs de nature peptidique, comme illustré à la **figure 3**, sont synthétisés sous formes immatures dans les organelles du corps cellulaire et atteignent leur forme mature dans les vésicules synaptique suite à leur acheminement à la terminaison synaptique par le système de microtubules (Fisher et al., 1988; Sossin et al., 1989).

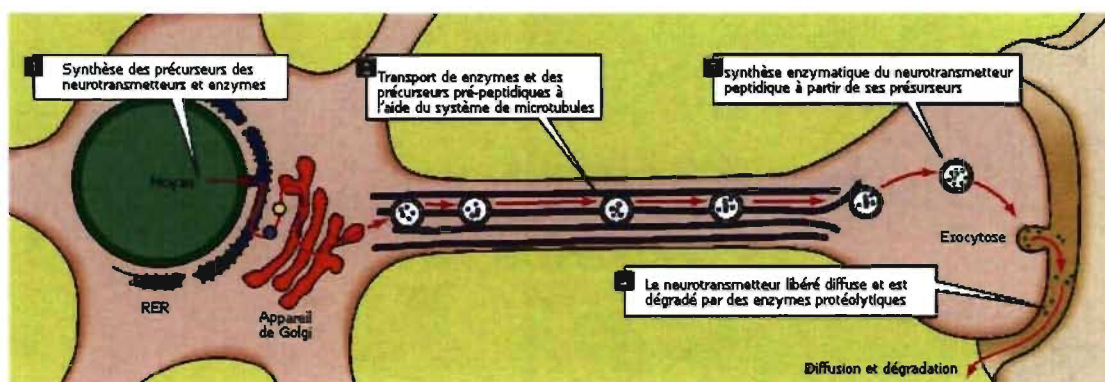
Les neurotransmetteurs sont ensuite stockés dans deux types de vésicules différenciables en microscopie électronique, soit les vésicules à centre clair et les vésicules à centre dense. Les neurotransmetteurs à petites molécules comme l'ACh le glutamate et les catécholamines sont stockés dans les vésicules claires de 40-60 nm de diamètre, à l'aide de transporteurs énergivores localisés sur la membrane vésiculaire. Les neurotransmetteurs peptidiques sont pour leur part empaquetés dans des vésicules à centre dense d'un diamètre variant de 90-250 nm.

**Figure 2 Synthèse des neurotransmetteurs à petites molécules**



La production des enzymes responsables de la synthèse des neurotransmetteurs à petites molécules se fait dans le corps cellulaire d'où ils sont transportés vers la terminaison à l'aide du transport axonal lent (1-2). La synthèse des neurotransmetteurs se fait par la suite au sein de la terminaison où ils sont par la suite emmagasinés dans des vésicules synaptiques (3). Les neurotransmetteurs libérés suite à l'exocytose des vésicules sont ensuite récupérés par la terminaison sous forme de précurseurs afin de reformer les neurotransmetteurs pour un cycle subséquent de libération (5) Tiré de Purves et al, 1999, Neurosciences. DeBoeck Université, Paris, Bruxelles, 602 pages.

**Figure 3 Synthèse des neuropeptides**



Les précurseurs des neuropeptides et des enzymes de synthèse sont synthétisés dans le corps cellulaire du neurone d'où ils sont par la suite distribués à la terminaison synaptique à l'aide du système des microtubules (1-2). Une fois dans la terminaison, les enzymes catalysent la formation des neurotransmetteurs peptidiques à partir de leurs précurseurs (3). Les neuropeptides sont par la suite libérés dans la fente synaptique d'où ils diffusent et sont dégradés par des enzymes protéolytiques (4). Tiré de Purves et al, 1999, Neurosciences. DeBoeck Université, Paris, Bruxelles, 602 pages.

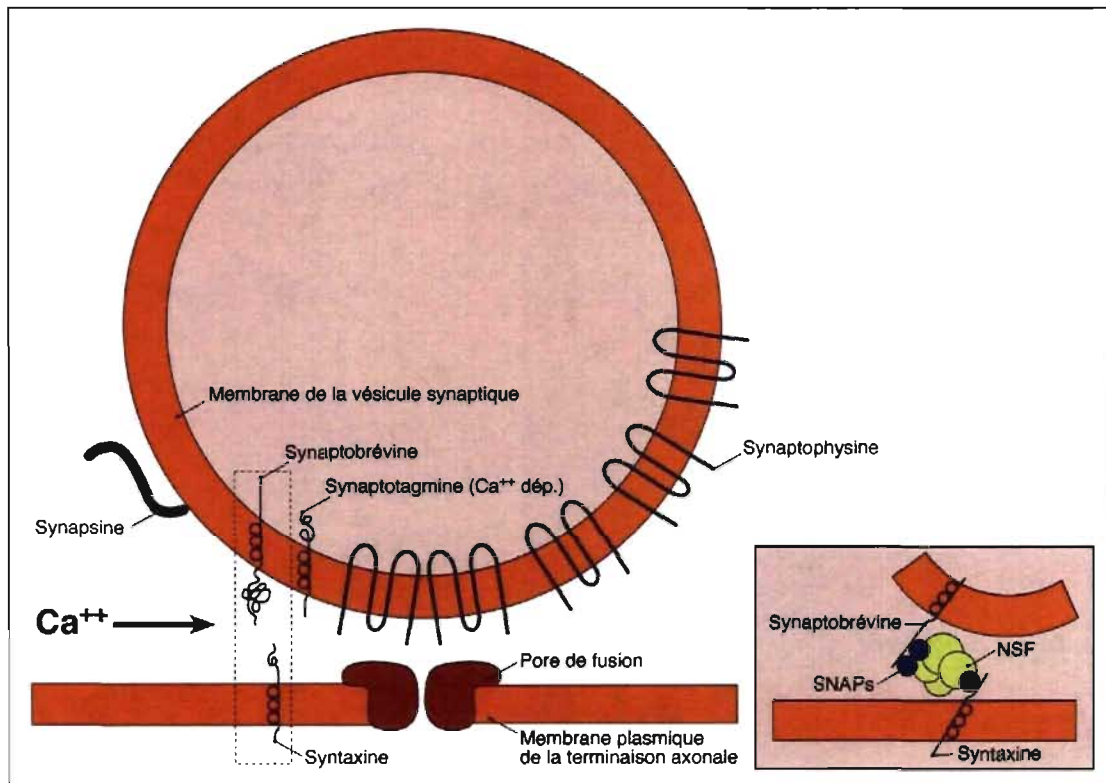
#### 1.2.2.1.1.2. La distribution et le ciblage des vésicules synaptiques

Une fois les vésicules claires chargées de neurotransmetteurs, elles se distribueront dans le cytoplasme neuronal en deux groupes distincts. Soit dans le groupe de vésicules de réserve, localisé à distance de la membrane plasmique et le groupe de vésicules prêtes à être libérées lesquelles sont directement apposées à cette membrane au niveau de la zone active.



Les vésicules de réserve sont immobilisées aux filaments du cytosquelette par l'intermédiaire des synapsines (De Camilli et al., 1990) (voir **figure 4**). Ces protéines sont le substrat de protéines sensibles au calcium dont la camKinase et la PKA. L'entrée de calcium dans la terminaison active les kinases permettant la phosphorylation des synapsines et la libération des vésicules du réseau de cytosquelette (Greengard et al., 1994). Les vésicules sont ensuite acheminées à leur site d'arrimage à l'aide des petites protéines RabA et C liées au GTP. Ces dernières s'attachent aux vésicules via leur portion C-terminale. L'hydrolyse du GTP est impliquée dans le ciblage des vésicules à leur site d'arrimage et leur maintien à cet endroit. Lorsque les vésicules seront sollicitées pour l'exocytose Rab-GDP se dissociera stimulant l'échange du GDP pour le GTP (Cai et al., 2007). De plus, le ciblage des vésicules à la membrane stimule une série d'interactions entre protéines vésiculaires et protéines membranaires, nommées vSNARE et tSNARE respectivement, permettant de compléter l'arrimage. Ces interactions incluent l'association de la protéine vésiculaire synaptobrevine (VAMP) avec les protéines membranaires (SNAP25 et syntaxine) et la formation d'un complexe très stable (Chen et Scheller, 2001; Jahn et al., 2003). La syntaxine possède aussi la propriété particulière de s'associer aux canaux calciques de la terminaison permettant la colocalisation des vésicules près d'une source de calcium, élément clef et régulateur de l'exocytose comme il sera mentionné dans les prochains paragraphes (Bennett et al., 1992; David et al., 1993).

**Figure 4** Schéma des protéines impliquées dans l'exocytose



Représentation des différentes protéines impliquées dans l'exocytose des vésicules synaptiques.

#### 1.2.2.1.1.3. Exocytose des vésicules

Suite au ciblage des vésicules à la zone active et la formation du complexe stable entre ces dernières et la membrane plasmique, les vésicules sont prêtes à être libérées. C'est alors l'entrée du calcium survenant suite à l'arrivée du potentiel d'action qui permettra de déclencher la libération des neurotransmetteurs. La rapidité avec laquelle se déroule l'exocytose suite à l'entrée de calcium dans la terminaison (moins de  $300\mu\text{s}$ ) est non seulement due à la colocalisation du complexe près de la source de calcium mais suggère aussi que les vésicules soient déjà dans un état amorcé (Sudhof, 2000). Par ailleurs, la rapidité avec laquelle s'exécute la libération suggère que le processus de fusion soit déjà entamé avant l'entrée des ions

calciques. En effet, il est suggéré que les vésicules seraient maintenues dans un état inhibé par la synaptotagmine. Cette protéine vésiculaire servirait de frein à la pré-fusion en s'associant de manière calcium dépendante à la bicouche lipidique de la terminaison présynaptique (Sudhof, 2000). La sensibilité au calcium de la synaptotagmine augmente de manière dramatique lorsque cette dernière est associée à la bicouche lipidique permettant de libérer le frein et faciliter l'exocytose (Fernandez et al., 2001). Une seconde hypothèse, quant au rôle de la synaptotagmine dans l'exocytose, a aussi été démontrée. En effet, selon cette hypothèse la synaptotagmine servirait plutôt de régulateur positif en stimulant la fusion des vésicules. Dans un cas comme dans l'autre, la synaptotagmine joue le rôle de détecteur en stimulant la fusion des vésicules suite à une entrée massive de calcium à ses abords, propriété dont les implications sont essentielles au bon fonctionnement de la synapse.

Suite à l'entrée de calcium dans la terminaison, les membranes plasmiques et vésiculaires se fusionnent permettant la libération du contenu vésiculaire dans la fente synaptique. L'exocytose peut être étudiée expérimentalement par les mesures des changements de capacitance membranaire observés suite à libération de neurotransmetteurs. En effet, la fusion des vésicules à la membrane plasmique induit des sauts dans la capacitance membranaire (Neher et Marty, 1982). Ces données révèlent la présence de deux modes d'exocytose. En effet, on observe soit des sauts soutenus de capacitance correspondant à la fusion complète des vésicules avec la membrane, soit de petites et transitoires variations de capacitance. Ces observations ont menées à la description de l'exocytose complète et de l'exocytose partielle, nommée kiss and run. Ce dernier mode d'exocytose impliquerait que la fusion des membranes vésiculaire et plasmique génère la formation d'un pore dont l'ouverture serait réversible. En effet, ce pore de fusion peut se refermer expliquant la libération transitoire ou se dilater et permettre la fusion complète des membranes. La composition soit entièrement lipidique ou protéinique (comme un canal ionique) du pore n'est toutefois pas encore connue mais des évidences suggèrent un rôle des SNARE dans sa formation.

#### 1.2.2.1.1.4. Recyclage des vésicules

Suite à l'exocytose les membranes doivent être récupérées et recyclées afin de régénérer le stock de vésicules synaptique. Pour assurer un recyclage efficace des vésicules, la première étape est le désassemblage du complexe très stable formé par les vSNAREs et tSNAREs. Cette étape cruciale nécessite l'apport énergétique d'une molécule d'ATP ainsi que des protéines SNAP et NSF. Suite à la destruction de ce complexe, les mécanismes de recyclage des vésicules peuvent se mettre en branle. Les mécanismes impliqués dans le recyclage des vésicules dépendent en grande partie du mode d'exocytose.

- 1) Dans le cas de l'exocytose complète, les protéines vésiculaires, maintenant associées à la membrane plasmique, doivent être récupérées par endocytose via la formation de vésicules de clathrine. Ce mode d'endocytose fut démontré par les expériences pionnières élaborées par Heuser et Reese à la JNM de grenouille (Heuser et Reese, 1973). Dans ce cas, les protéines vésiculaires seront triées à l'aide du système endosomal.
- 2) Dans le second cas, où les neurotransmetteurs sont libérés à travers le pore de fusion et que la fusion des membranes n'est que partielle, il a été démontré que les vésicules ne restent pas attachées à la membrane plasmique. En effet, ces dernières s'éloignent de la membrane plasmique et seront de nouveau remplies localement de neurotransmetteurs d'où le nom "kiss and run" donné à ce type d'exocytose (Ceccarelli et al., 1973).
- 3) Une seconde forme d'exocytose partielle, nommée pour sa part "kiss and stay" se distingue par le fait que les vésicules demeurent à la zone active d'où elles se remplissent de nouveau (Barker et al., 1972). Ce mode d'exocytose serait prépondérant lors de stimulations à basses fréquences lorsque seulement un petit nombre de vésicules est suffisant. Une fois

rechargées en neurotransmetteurs, les vésicules servent à régénérer la réserve de vésicules de la terminaison présynaptique (Sudhof, 2000).

#### **1.2.2.1.1.5. Rôles, sources et régulation du calcium présynaptique**

Comme mentionné dans l'introduction de cette section, les travaux pionniers de Katz et collaborateurs ont permis de mettre en évidence l'implication du calcium dans la libération de neurotransmetteurs. En effet, ils ont notamment démontré que les modifications des niveaux de calcium extracellulaires changent l'amplitude des potentiels postsynaptiques enregistrés (Sudhof, 2000). Dès lors, un intérêt s'est développé pour comprendre l'implication du calcium dans la transmission synaptique et les mécanismes régulateurs impliqués dans le contrôle des taux de calcium de la terminaison nerveuse.

Une grande partie du calcium impliqué dans la transmission synaptique provient du milieu extracellulaire qui dans ce compartiment se retrouve sous forme libre. Le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique est très grand ( $[Ca^{2+}]_{out} > [Ca^{2+}]_{in}$ ) si bien que la force qui pousse les ions calciques vers l'intérieur des cellules est importante. D'autre part, le potentiel hyperpolarisé des cellules au potentiel de repos tend lui aussi à faire entrer les ions dans la cellule. Ces deux forces réunies font en sorte que la force électrochimique, qui tend à faire entrer les ions calciques dans la cellule, est très large. Cependant, au potentiel de repos la perméabilité calcique est faible par le fait que les canaux sont dans leur état fermé. C'est seulement avec l'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison nerveuse que la perméabilité pour les ions calciques augmente permettant l'entrée de calcium dans la cellule. La présence en forte concentration des canaux calciques voltage-dépendants dans la terminaison, fut mise en évidence par les travaux de Llinas et collaborateurs dans la terminaison présynaptique de calmar (Llinas, 1982). L'influx calcique est 10 fois supérieur au niveau de la zone active par rapport aux autres régions de la cellule du à l'accumulation de canaux calciques dans cette région. Cette distribution des canaux calciques permet de localiser les élévations calciques

près des vésicules synaptiques et de la machinerie d'exocytose. Il existe plusieurs types de canaux calciques dont les propriétés diffèrent. Les formes généralement retrouvées dans les neurones, et qui participent activement à la neurotransmission, sont des canaux type P/Q, N et R. En règle générale, ces canaux s'activent à des potentiels dépolarisés atteints lors de l'arrivée du potentiel d'action provoquant l'ouverture des canaux sodiques et potassiques.

La sensibilité accrue au calcium de la libération de neurotransmetteurs suggère l'importance des mécanismes mis en place afin de dissiper rapidement les ions calciques dans la terminaison. Une stagnation du calcium dans la terminaison pourrait causer une libération excessive de neurotransmetteurs. Parmi les mécanismes mis en place par les neurones pour évacuer le calcium, on retrouve, notamment, des protéines capables de modifier les concentrations de calcium intracellulaires en agissant comme pompes et échangeurs dont :

- La pompe calcique dépendante de l'ATP qui permet la sortie du calcium et le maintien des concentrations de calcium dans l'ordre du nanomolaire (Zylinska et al., 2002).
- L'échangeur calcium/sodium échange les ions dans un rapport de trois pour un respectivement permettant aussi la sortie de calcium du cytoplasme.

D'autre part, il existe des réserves intracellulaires de calcium qui permettent de tamponner l'excès de calcium lorsque ces réserves sont vides ou de le libérer dans le milieu intracellulaire lorsque leur contenu en calcium est élevé. Ces réserves intracellulaires sont constituées par les mitochondries et le réticulum endoplasmique.

- Les mitochondries ont comme rôle de tamponner le calcium ou de le libérer selon les conditions de stimulation.
- Pour sa part, le réticulum endoplasmique agit comme source principale de calcium intracellulaire. Cependant, tout comme les mitochondries il peut aussi agir, sous certaines conditions, en tamponnant l'excès de calcium. Il

existe deux types de réserves calciques provenant du réticulum endoplasmique soit les réserves sensibles à l'inositol-1,4-5-*trisphosphate* (IP<sub>3</sub>) et les réserves de type CIRC (calcium-induced calcium release).

Les réserves sensibles à l'IP<sub>3</sub> sont recrutées suite à la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G qui activent la phospholipase C (PLC) laquelle catalyse la production d'IP<sub>3</sub> à partir du *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (PIP<sub>2</sub>) présent dans la bicouche membranaire. La fixation de l'IP<sub>3</sub> avec son récepteur localisé sur le réticulum endoplasmique stimule la libération du calcium. Il est intéressant de noter que le récepteur à l'IP<sub>3</sub> est lui-même sensible aux concentrations calciques présentes dans son voisinage.

Pour leur part, les récepteurs de type CIRC libèrent le calcium suite à la stimulation par le calcium de leurs récepteurs de surface. Ces récepteurs sont sensibles à la ryanodine laquelle maintient le récepteur dans son état ouvert. Ainsi, plusieurs mécanismes sont mis en place afin d'assurer le maintien d'une concentration appropriée de calcium dans la terminaison nerveuse, élément essentiel au bon fonctionnement de la synapse.

#### 1.2.2.1 TRANSDUCTION DU MESSAGE

Le destin réservé aux neurotransmetteurs libérés par la terminaison synaptique est multiple. Le rôle principal des neurotransmetteurs est sans contredit l'activation des récepteurs postsynaptiques nécessaire à l'activation ou l'inhibition du neurone postsynaptique. Toutefois, de la quantité de neurotransmetteur libérée, une certaine proportion est utilisée afin d'activer les récepteurs présynaptiques et gliaux. D'autre part, les neurotransmetteurs sont rapidement enlevés de la fente synaptique par des systèmes de transporteurs ou des enzymes extracellulaires afin d'y limiter leur temps de transit.

### 1.2.2.1.1 Activation des récepteurs postsynaptiques

La membrane postsynaptique apposée aux sites de libération présynaptique est une région spécialisée composée d'une grande variété de protéines dont les fonctions sont axées au transfert de l'information neuronale. De ces protéines font notamment partie les récepteurs pour les divers neurotransmetteurs. Ces récepteurs permettent la traduction du message chimique, encodé par la quantité de neurotransmetteur présente dans la fente synaptique, en message électrique, encodé par la conséquente dépolarisation ou hyperpolarisation reflétant leur activation (Ruff, 1998). Il existe principalement deux types de récepteurs soit les récepteurs ionotropes et métabotropes, dont les mécanismes d'action et propriétés cinétiques diffèrent.

Les récepteurs ionotropes, sont des récepteurs canaux qui, suite à leur activation par leur agoniste spécifique, permettent l'ouverture d'un canal laissant passer spécifiquement un ion ou une classe d'ions causant ainsi des changements dans le potentiel de la cellule postsynaptique (Dingledine et al., 1999). Pour leur part, les effets de l'activation des récepteurs métabotropes sont plus lents dû à la nature des mécanismes qu'ils impliquent. En effet, l'activation des récepteurs métabotropes peut aussi mener à l'ouverture de canaux ioniques mais par l'intermédiaire de l'activation de plusieurs molécules intracellulaires, notamment les protéines G. Les protéines G ont comme rôle d'activer leur ligand spécifique dont font partie les protéines kinases et les canaux ioniques. La structure, la génétique et les propriétés cinétiques des récepteurs ionotropes et métabotropes seront détaillées par la description des récepteurs au glutamate à la section 1.4.2. L'effet d'un neurotransmetteur sur le neurone postsynaptique dépend donc du type de récepteur présent sur la cellule. Par exemple, l'ACh a des effets différents selon qu'elle active des récepteurs de type ionotropes (de type nicotinique) ou de type métabotropes (de type muscarinique). Ainsi, c'est le type de récepteur qui détermine l'effet de l'ACh sur un neurone.



D'autre part, la réponse postsynaptique est souvent le résultat de la sommation de plusieurs afférences divergentes. En effet, le potentiel seuil de déclenchement du potentiel d'action est en général atteint dans le SNC par la libération coïncidente de plusieurs terminaisons présynaptiques sur un même neurone postsynaptique. La dépolarisation induite par une seule terminaison étant fréquemment insuffisante pour déclencher un potentiel d'action. De plus, un même neurone peut aussi bien recevoir des afférences excitatrices qu'inhibitrices, qu'il doit intégrer afin de générer un signal unique. L'intégration de cette panoplie d'inputs dépend des propriétés passives du neurone (constante de temps et d'espace) ainsi que de la localisation des synapses sur ce dernier (Gulledge et al., 2005). En effet, les synapses peuvent se faire à plusieurs endroits sur les neurones. Selon son emplacement sur le neurone, corps cellulaire, terminaison synaptique, dendrites ou axones, la synapse génère des signaux dont les caractéristiques varient. En règle générale, les synapses sur les terminaisons sont modulatrices alors que celles sur les dendrites sont excitatrices tandis que celles sur les corps cellulaires sont inhibitrices. Ainsi, le résultat de la libération de neurotransmetteurs par la terminaison dépend non seulement des caractéristiques de la libération (nature, quantité et cinétique de libération du neurotransmetteur) mais aussi des caractéristiques du neurone postsynaptique et de l'emplacement de la synapse.

#### **1.2.2.1.2 Activation des autorécepteurs**

La libération de neurotransmetteurs ne fait pas seulement qu'activer des récepteurs présents sur les neurones postsynaptiques. En effet, le neurone présynaptique possède également des récepteurs, nommés autorécepteurs, capables d'être activés lors de la neurotransmission. Ces récepteurs peuvent être de type ionotrope ou métabotrope et permettent, de réguler à la hausse ou à la baisse la quantité de neurotransmetteur subséquent libérée (Engelman et MacDermott, 2004). Par exemple, l'activation de récepteurs canaux perméables au sodium et au potassium permet la dépolarisation des neurones facilitant l'atteinte du seuil de déclenchement du potentiel d'action. Finalement, l'activation des autorécepteurs

couplés aux protéines G peut mener à la production de substances neuromodulatrices agissant ainsi de manière plus indirecte sur la neurotransmission.

#### **1.2.2.1.3 Activation des cellules gliales**

L'association intime des cellules gliales avec les synapses les place en excellente position pour moduler la transmission synaptique. Les expériences récentes démontrent que les cellules gliales réagissent à l'activité nerveuse et y répondent par l'intermédiaire de récepteurs localisés sur leur membrane (Cornell-Bell et al., 1990; Porter et McCarthy, 1997). En règle générale, les récepteurs présents sur les éléments neuronaux se retrouvent également sur les cellules gliales les entourant. Les cellules gliales possèdent donc non seulement la machinerie pour détecter l'activité nerveuse mais sont capables d'y répondre en relâchant des molécules neuromodulatrices nommées gliotransmetteurs, capables d'influencer l'état de la synapse (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998a; Martineau et al., 2006; Koizumi et Fujishita, 2007).

#### **1.2.2.1.4 Clairance des neurotransmetteurs**

Comme discuté aux sections précédentes, le destin des neurotransmetteurs est multiple. Non seulement ils activent les récepteurs postsynaptiques, ils activent aussi des autorécepteurs et des récepteurs gliaux. Ainsi, la portée de leur action est multiple permettant d'envisager l'existence de multiples mécanismes contrôlant la durée du transit du neurotransmetteur dans la fente synaptique. En effet, la quantité excédentaire de neurotransmetteur doit être enlevée de la fente synaptique rapidement afin de générer des dépolarisations brèves (Danbolt, 2001). Deux mécanismes principaux sont utilisés afin de maintenir et contrôler le niveau de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Premièrement, des enzymes de dégradation, y sont présentes et permettent de limiter la portée d'action du neurotransmetteur. La présence de ces enzymes a été démontrée pour la sérotonine

et l'ACh, lesquels sont dégradés par la monoamine oxydase et l'acétylcholinestérase respectivement. Le second système responsable de l'élagage des neurotransmetteurs de la fente synaptique implique des transporteurs membranaires spécifiques. Ces transporteurs permettent la réabsorption au sein des cellules des neurotransmetteurs et leur recyclage pour des cycles subséquents de neurotransmission (Danbolt, 2001). Parmi ces systèmes figurent des transporteurs pour la sérotonine, la dopamine, la noradrénaline ainsi que pour le glutamate dont il sera largement question à la section 1.4.3. L'effet de l'activation des récepteurs postsynaptiques n'est donc pas uniquement le reflet de la quantité initiale de neurotransmetteurs libérés. En effet, le résultat final de la libération de neurotransmetteurs dépend aussi de systèmes de transporteurs et de la dégradation enzymatique qui modifient la concentration de neurotransmetteurs disponible pour le neurone postsynaptique.

### 1.3 LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

La description des mécanismes et propriétés de la transmission synaptique faite dans les sections précédentes est applicable, de manière générale, à toutes les synapses du système nerveux. Cependant, il est essentiel de noter qu'elles possèdent toutes des spécificités leur étant propres. Notamment, la JNM est caractérisée par la présence de la cellule musculaire faisant office d'élément postsynaptique. Une autre caractéristique de la JNM réside dans la simplicité de ses connexions. En effet, de manière générale les cellules musculaires sont innervées par une seule terminaison motoneuronale. Cette simplicité morphologique de la JNM, relativement aux synapses centrales possédant des connexions multiples et complexes, fait de la JNM un modèle d'étude attrayant. La contribution des afférences présynaptiques étant unique, l'interprétation des événements enregistrés dans le compartiment postsynaptique est d'autant simplifiée (Ogata, 1988). De plus, pratiquement chaque influx nerveux parcourant le nerf moteur induit un potentiel d'action dans les fibres musculaires qu'il innerve contrairement aux synapses centrales où l'intégration de plusieurs inputs est nécessaire afin d'évoquer un potentiel d'action. Cette propriété est le reflet de la capacité de la terminaison présynaptique à libérer de manière fiable une quantité suffisante de neurotransmetteurs permettant la dépolarisation au seuil d'émission du potentiel d'action. De plus, de nombreuses protéines synaptiques diffèrent de celles retrouvées dans le système nerveux central, caractéristique étant aussi responsable de la particularité de la JNM. Afin de comprendre l'impact de ces différences sur la transmission et la plasticité synaptique une description plus détaillée de la JNM sera faite dans les prochaines sections.

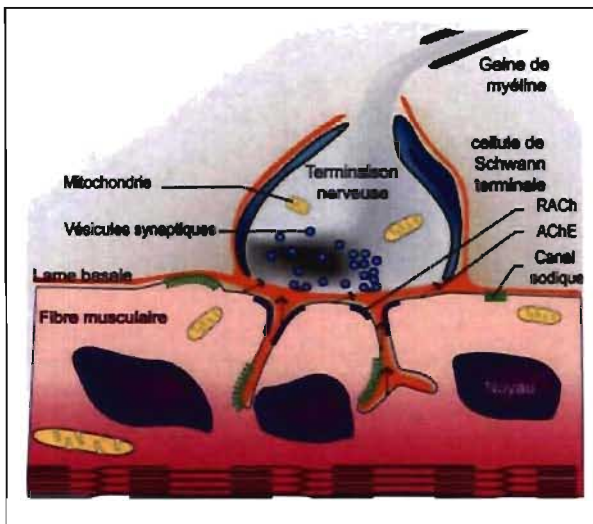
#### 1.3.1 ANATOMIE DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

La JNM est constituée de la terminaison motoneuronale, de la fibre musculaire et complétant la synapse tripartite, des cellules de Schwann pérисynaptiques (PSCs). La morphologie des terminaisons synaptiques varie selon

les espèces mais elles sont généralement classifiées en trois groupes soit : en terminaisons en grappe, en plaque ou en “endbuschel” (Tiegs, 1953). Les terminaisons en plaque, caractéristiques des mammifères, sont généralement confinées à une zone de forme ovale à la surface musculaire. Les terminaisons en grappe, observées notamment chez les reptiles, sont caractérisées par des branchements focaux sur des varicosités très fines. Pour leur part, les terminaisons “endbuschels” consistent en de multiples projections en ruban parallèles aux fibres musculaires et sont caractéristiques des jonctions neuromusculaires d’amphibiens (Desaki et Uehara, 1981; Bennett, 1983). Ces terminaisons sont apposées aux replis de la membrane postsynaptique au sommet desquels se retrouvent les récepteurs à l’ACh. Ce complexe est recouvert par les cellules de Schwann pérисynaptiques comme illustré à la **figure 5**.

Les muscles squelettiques sont pour leur part composés d’une série de fibres musculaires plurinuclées lesquelles sont innervées par les terminaisons de cellules motoneuronales dont les corps cellulaires se retrouvent dans la moelle épinière. À l’approche de sa cible, la terminaison perd son recouvrement de myéline pour permettre la formation de la jonction neuromusculaire. L’une des caractéristiques morphologique marquante de la région présynaptique est l’alignement précis de la zone active, à laquelle on retrouve les vésicules synaptiques, directement en face des replis synaptiques de la membrane postsynaptique à la crête desquels se concentrent les récepteurs cholinergiques. Font partie de la zone active non seulement les vésicules mais aussi les canaux calciques de type P/Q (souris) ou N (grenouille) alignés en rangées parallèles doubles apposés eux aussi aux replis synaptiques (Robitaille et al., 1990; Seagar et al., 1999). Cette caractéristique permet la colocalisation de l’entrée de calcium avec les vésicules synaptiques et leur apposition près des récepteurs postsynaptiques.

**Figure 5 Diagramme de la jonction neuromusculaire**



Représentation de la JNM et de ses composantes. Il est intéressant de noter que les zones actives sont centrées sur les replis synaptiques où l'on retrouve les récepteurs de type nAChR. Reproduit avec permission de Eric Krejci ©

La description de la JNM faite dans les paragraphes précédents représente une version simplifiée de la réalité. En effet, la JNM est aussi caractérisée par la présence de trois à cinq cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs) qui, chez la grenouille, forment des prolongements à l'intérieur de la fente synaptique s'approchant à quelques micromètres des zones actives (voir **figure 5**). Les dernières années ont été fertiles en démonstrations de l'implication des PSCs dans la physiologie de la JNM et bien que leur rôle dans la maintenance et le développement ne fasse, depuis longtemps, plus aucun doute, leur rôle dans la modulation de la transmission synaptique émerge. Notamment, des évidences démontrent que les PSCs modulent non seulement la transmission synaptique mais aussi les phénomènes de plasticité dont la dépression synaptique (Robitaille, 1998; Auld et al., 2003). Les PSCs répondent à l'activité présynaptique par des élévations de leur taux de calcium suivant l'activation des récepteurs muscariniques et purinergiques localisés à leur surface (Reist et Smith, 1992; Robitaille, 1995; Rochon et al., 2001). De plus, les PSCs peuvent synthétiser des facteurs trophiques dont la neuréguline et NGF (nerve growth factor) stimulant la survie neuronale, la croissance des motoneurones et l'extension des prolongements gliaux (Bunge, 1994; Sanes et Lichtman, 1999; Gomes et al., 2001). Les PSCs sont aussi capables de répondre aux facteurs trophiques neuronaux dont la neuréguline (Trachtenberg et Thompson,

1996). D'autre part, les CSPs jouent un rôle important dans la réinervation suite à une lésion et pendant le développement. En effet, les CSPs sont impliquées dans l'induction de la croissance neurale en plus de servir de guide pour la croissance axonale (Son et al., 1996).

La fente synaptique, d'une largeur de 50nm sépare la terminaison présynaptique de la fibre musculaire. Elle est constituée de la lame basale composée notamment de collagène, laminine et fibronectine et permet la liaison avec des récepteurs sur la surface des cellules avoisinantes et l'adhésion entre les composantes de la JNM (Patton, 2003). L'une des caractéristiques principale de la fente synaptique à la JNM est la présence de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) laquelle est concentrée dans la lame basale. L'AChE permet la dégradation de l'ACh suite à sa libération par le motoneurone avec une efficacité et une rapidité d'action impressionnante.

L'apposition des nAChR aux lèvres des replis synaptiques, en face des zones actives, joue un rôle clef dans l'efficacité de la transmission à la JNM. Les nAChR sont composés de cinq sous-unités ( $2\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) lesquelles participent toutes à la formation du pore (Lindstrom, 2003). Les sous-unités sont constituées de 4 segments transmembraires (M1 à M4) dont les extrémités C et N terminales sont extracellulaires (Karlin et Akabas, 1995). L'activation du canal ionique se fait par l'association de deux molécules d'ACh avec les sous-unités  $\alpha$  du récepteur. L'ouverture du canal permet l'entrée de sodium et de calcium et la sortie de potassium et est responsable de la dépolarisation de la fibre musculaire. La dépolarisation est cependant presque uniquement le reflet de l'entrée de sodium dû au potentiel très négatif de la fibre musculaire (-80 à -90 mV) et à la large concentration des ions sodiques dans le milieu extracellulaire qui en entrant dans la cellule limitent stériquement la sortie de potassium et l'entrée de calcium. Si la dépolarisation est suffisante pour l'atteinte du seuil d'émission du potentiel d'action, correspondant au seuil d'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendents alors ce dernier sera déclenché. Le courant observé suite à la libération d'ACh, nommé potentiel de plaque motrice (PPM), et qui est le reflet de l'activation des AChRs est

généralement d'amplitude suffisante pour permettre l'activation des canaux sodiques et la conversion du PPM en potentiel d'action.

### 1.3.2 CONTRACTION MUSCULAIRE

Le rôle physiologique de la transmission motoneuronale est la genèse de la contraction musculaire. L'activation des nAChRs et des canaux sodiques permet la dépolarisation soutenue de la fibre musculaire et l'initiation du potentiel d'action dans les fibres musculaires. La dépolarisation induite par la propagation du potentiel d'action à la surface des fibres musculaire ne génère pas de courants ioniques assez puissants dans le centre des fibres dû à leur imposant diamètre. La présence d'invaginations de la membrane sarcoplasmique, nommées tubules-T, est essentielle à l'entrée de la dépolarisation dans la fibre musculaire et l'atteinte des éléments impliqués dans la genèse de la contraction musculaire. En effet, les tubules T sont apposés au réticulum sarcoplasmique lequel sert de réservoir calcique musculaire. La dépolarisation induite par l'arrivée du potentiel d'action au niveau des tubules-T provoque des changements de conformation des récepteurs calciques voltage-dépendants de type L (ou DHPR) (Rios et Brum, 1987) localisés sur la membrane plasmique au niveau des tubules. Ces récepteurs agissent comme des senseurs au voltage qui, par adossement avec les récepteurs à la ryanodine localisés sur la membrane du réticulum sarcoplasmique, modifient la conformation des ces derniers. Ce changement de conformation active le récepteur canal augmentant ainsi sa perméabilité calcique et provoque la sortie du calcium accumulé dans le réticulum. Il existe trois types de récepteurs à la ryanodine (RyR-1, -2 et -3) dérivant de trois gènes différents et l'isoforme retrouvé de manière prépondérante dans les fibres musculaires est la forme RyR-1 (Iino, 1999). Ceci permet donc de coupler la stimulation électrique du muscle à la sortie de calcium des réserves intracellulaires. Bien que les canaux DHPR soit des canaux calciques, le calcium ne semble cependant pas l'élément essentiel à l'activation des récepteurs à la ryanodine. Toutefois, sous certaines conditions l'élévation calcique locale permettrait d'activer les RyRs, mode de transduction nommée CIRC (calcium-induced calcium release)



(Pizarro et al., 1991). Ce mode d'activation ne serait néanmoins pas le mécanisme primaire permettant la sortie du calcium des réserves intracellulaires du réticulum sarcoplasmique (Miledi et al., 1984; Brum et al., 1988). La présence des tubules-T et leur association intime avec le réticulum sarcoplasmique permet donc de synchroniser la sortie de calcium des réserves intracellulaires à l'arrivée du potentiel d'action.

De plus, la sortie de calcium ne se fait pas de manière aléatoire au sein des cellules musculaires. En effet, il existe un alignement presque parfait entre les éléments impliqués dans la mobilisation du calcium et la machinerie contractile formée de la myosine et de l'actine (Dulhunty et Franzini-Armstrong, 1975; Zampighi et al., 1975). La liaison du calcium suite à sa sortie des réserves intracellulaires induit un changement de conformation des filaments d'actine libérant ses sites d'interaction avec la myosine. Cette association induit un changement de conformation de la myosine permettant un déplacement dans l'axe des fibres musculaires et le raccourcissement des fibres, mouvement responsable de la contraction. Ainsi, la contraction musculaire est essentiellement dépendante du calcium dans l'entourage des éléments contractiles. Plusieurs mécanismes de recapture du calcium sont mis en place afin d'assurer la rapidité et la brièveté de la contraction musculaire. En effet, le calcium est recyclé dans le réticulum sarcoplasmique par l'intermédiaire de pompes calciques.

### **1.3.3 APPROCHES POUR L'ÉTUDE DE LA JNM**

La JNM représente un bon modèle pour l'étude de la synapse. En effet, tout les éléments de la synapse tripartite peuvent être étudiés séparément. L'activité présynaptique et gliale peuvent être étudiées à l'aide de l'imagerie calcique tandis que l'activité postsynaptique peut facilement être enregistrée à l'aide de techniques électrophysiologiques intracellulaires. Cette dernière technique permet l'enregistrement des potentiels postsynaptiques générés par le passage d'ions suite à l'ouverture des récepteurs canaux cholinergiques de type nicotiques localisés à la

plaque motrice. Les dépolarisations ainsi induites sont nommées potentiel de plaque motrice (PPMs). Ces derniers sont cependant observables uniquement suite au blocage partiel des récepteurs nicotiniques à l'aide de la d-tubocurarine ou de l' $\alpha$ -bungarotoxine. L'antagonisme partiel des récepteurs empêche l'atteinte du seuil d'émission du potentiel d'action lequel causerait la contraction musculaire incompatible avec les enregistrements électrophysiologiques. Ainsi, les PPMs sont le reflet de l'ouverture d'un certain pourcentage des récepteurs nicotiniques localisés à la plaque motrice.

En l'absence de stimulation motoneuronale, des événements spontanés, nommés PPM miniatures (PPMm), peuvent être observés et sont de l'ordre de 500 $\mu$ V (Katz et Miledi, 1967). L'étude de la modulation de la fréquence et de l'amplitude de ces événements spontanés par différents facteurs chimiques ou physiologiques permet l'identification du locus d'expression de la modulation. Par exemple, une modulation de la fréquence des événements spontanés indique généralement une modulation présynaptique. En effet, une diminution de la fréquence serait le résultat d'une diminution du nombre de vésicules libérées par la terminaison présynaptique. D'autre part, une modification de l'amplitude des événements serait plutôt le reflet d'une modification de la sensibilité de la cellule postsynaptique aux neurotransmetteurs. Cette propriété s'avère très utile lors de l'étude de l'effet de certaines drogues sur la physiologie neuromusculaire.

L'accessibilité de la JNM aux différentes techniques d'enregistrements ainsi que la simplicité de ses connexions font de cette synapse un bon modèle d'étude. Les connaissances acquises au fil des années concernant sa morphologie, sa physiologie, ses composantes moléculaires et son développement sont relativement bien détaillées et le modèle utilisé dans cette étude tire donc profit des ces particularités et avantages. De plus, le modèle animal spécifique de la JNM de grenouille *rana pipiens* offre d'autres avantages desquels la présente étude a su tirer profit. Entre autre, les préparations peuvent être utilisées *in situ* concernant l'intégrité morphologique de la synapse. De plus, la résistance et la robustesse de la préparation permettent des enregistrements de longue durée ainsi que des

manipulations complexes telle que l'iontophorèse. Les amphibiens, faisant partie de la grande famille des vertébrés, répondent aussi généralement très bien aux agents pharmacologiques commerciaux développés pour la plupart pour les cellules de mammifères. Toutes ces raisons font de la JNM d'amphibien l'un des modèles les mieux adaptés afin de répondre aux questions adressées dans cette étude notamment l'étude des mécanismes impliqués dans la modulation glutamatergique à la JNM.

## **1.4 NEUROTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE**

Le glutamate est l'un des 11 acides aminés dont les cellules de mammifères sont habilitées à faire la synthèse à partir de molécules disponibles. Le glutamate a comme fonction première dans l'organisme d'entrer dans la composition des protéines. Cependant, vers la fin des années 1950, Watkins et collaborateurs ont démontré l'implication du glutamate en tant que neurotransmetteur au niveau de la moelle épinière (Curtis et al., 1959, 1960). De nos jours, le glutamate est considéré comme le neurotransmetteur excitateur principal du SNC de mammifères et serait responsable de plus du tiers de l'activité synaptique excitatrice (Watkins et Evans, 1981). Depuis sa découverte, le nombre de synapses auxquelles il est associé s'est largement étendu. En effet, la présence du glutamate est maintenant établie dans plusieurs régions du SNC et SNP et le nombre de fonctions auxquelles il est associé est grandissant.

La quantité de glutamate agissant sous forme de neurotransmetteur représente uniquement 20% de tout le glutamate mis en réserve dans les cellules et se retrouve exclusivement dans les terminaisons synaptiques et les cellules gliales pérисynaptiques. La balance représente le glutamate utilisé à des fins métaboliques notamment à la fabrication de nouvelles protéines (Heath et Shaw, 2002). Alors comment l'organisme gère-t-il la synthèse et la distribution du glutamate entre les deux fonctions essentielles de synthèse de protéines et de neurotransmission glutamatergique? Cette question fera l'objet de la section suivante dans laquelle le cycle du glutamate à la synapse sera décrit afin de comprendre comment le glutamate neuroactif est séquestré dans les vésicules synaptiques.

### **1.4.1 LE CYCLE DU GLUTAMATE À LA SYNAPSE**

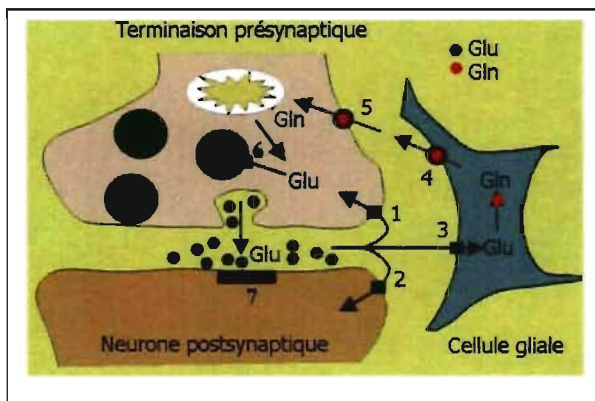
Le glutamate présent dans les cellules est produit à partir de l' $\alpha$ -cétooglutarate grâce à l'enzyme glutamate déshydrogénase ou provient directement de l'alimentation d'où il est distribué à l'organisme par le réseau vasculaire. Le

glutamate sanguin pénètre dans les cellules à l'aide d'un co-transporteur sodium-dépendant pour les acides aminés dicarboxyliques. Au sein des cellules neuronales, le glutamate (néoformé ou alimentaire) est emmagasiné dans les vésicules synaptiques à l'aide de transporteurs vésiculaires (voir section 1.4.3.4) d'où il est maintenant prêt à être libéré et à entamer le cycle du glutamate (Cousin et Robinson, 1999). Suite à la dépolarisation neuronale, le glutamate est libéré dans la fente synaptique d'où il doit être rapidement enlevé afin de mettre un terme à son effet. Ce glutamate est enlevé de la fente synaptique de trois façons (Daikhin et Yudkoff, 2000). Premièrement, par liaison du glutamate avec son récepteur postsynaptique bien que la contribution de ce phénomène à la réabsorption du glutamate est très faible. Deuxièmement, le compartiment présynaptique est capable, grâce à des systèmes de transporteurs (voir section 1.4.3) de réabsorber le glutamate. L'efficacité de cette réabsorption est cependant beaucoup moins importante que la recapture de glutamate par les cellules gliales périssynaptiques qui constitue la troisième voie de recapture (Gegelashvili et Schousboe, 1998). La présence des cellules gliales à la synapse et leur potentiel membranaire hyperpolarisé favorise l'entrée du glutamate par le transporteur sodium-dépendant (Erecinska et Silver, 1990). Les cellules gliales accumulent ainsi le glutamate qu'elles redistribuent par la suite aux neurones sous forme non-neuroactive. Cette transformation du glutamate prévient le transit du glutamate à la synapse ce qui pourrait provoquer l'activation de récepteurs postsynaptiques et augmenterait le ratio signal/bruit (Daikhin et Yudkoff, 2000). En effet, les cellules gliales transforment le glutamate en glutamine à l'aide de l'enzyme glutamine synthétase préférentiellement localisée dans ces dernières (Martinez-Hernandez et al., 1977; Norenberg et Martinez-Hernandez, 1979). Les neurones captent la glutamine grâce à des transporteurs sodium-indépendant et dépendant (Schousboe et al., 1979; Ramaharobandro et al., 1982; Yudkoff et al., 1989). La glutamine est utilisée comme carburant pour les neurones (Erecinska et al., 1988) et elle sert aussi à refaire les réserves de glutamate. En effet, le glutamate est re-synthétisé à partir de la glutamine par l'enzyme mitochondriale glutaminase phosphate-dépendante (Daikhin

et Yudkoff, 2000). La régénération du glutamate ferme ainsi la boucle du cycle du glutamate. Le cycle du glutamate est résumé et illustré à la **figure 6**.

La description exposée ci-dessus ne représente toutefois qu'une seule voie du métabolisme du glutamate. En effet, le glutamate absorbé par les cellules gliales peut aussi être utilisé afin de générer du lactate servant d'énergie aux neurones (Hassel et Sonnewald, 1995). De plus, les cellules pourraient régénérer le glutamate de manière indépendante de la glutamine (Hassel et Brathe, 2000). En résumé, l'efficacité du cycle du glutamate dépend de la compartimentalisation anatomique, laquelle permet le maintien des conditions essentielles à la neurotransmission glutamatergique. En effet, cette organisation permet de conserver une concentration faible de glutamate dans l'entourage des cellules et permet le recyclage du glutamate.

**Figure 6 Cycle du glutamate**



Représentation simplifiée du cycle du glutamate. Suite à la libération du glutamate (Glu) par la terminaison présynaptique, il est recapté par des systèmes de transporteurs localisés à la synapse (1-2). Une majeure partie du glutamate est cependant transporté dans les cellules gliales péricytoplasmiques (3) où il est transformé en sa forme non

neuroactive la glutamine et libéré sous cette forme dans le milieu extracellulaire (4). La glutamine (Gln) va par la suite être réabsorbée par les neurones (5) qui à l'aide d'enzymes mitochondriales retransforment la glutamine en glutamate qui sera réincorporé aux vésicules synaptiques (6) et libéré lors de cycles subséquents de libération permettant l'activation des récepteurs postsynaptiques (7). **Modifié avec permission de Tao et al., 2005**

### 1.4.2 RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE

Suite à sa libération, le glutamate affecte les neurones par l'intermédiaire de deux groupes de récepteurs soit les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques. Il existe au sein de ces deux groupes une diversité de récepteurs dont les fonctions et propriétés diffèrent. Cette diversité explique les nombreux effets répertoriés du glutamate sur la fonction synaptique. La **figure 7** illustre la diversité des récepteurs au glutamate ainsi que leur perméabilité ou leur effet cellulaire.

**Tableau 1 Résumé des différentes classes de récepteurs au glutamate**

	GLUTAMATE					
	ionotropique			Métabotropique		
Type	NMDA	AMPA	Kainate	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Sous-Unité	<i>NR1</i>	<i>GluR1</i>	<i>GluR5</i>	<i>mGluR1</i>	<i>mGluR2</i>	<i>mGluR4</i>
	<i>NR2A</i>	<i>GluR2</i>	<i>GluR6</i>	<i>mGluR5</i>	<i>mGluR3</i>	<i>mGluR6</i>
	<i>NR2B</i>	<i>GluR3</i>	<i>GluR7</i>			<i>mGluR7</i>
	<i>NR2C</i>	<i>GluR4</i>	<i>KA-1</i>			<i>mGluR8</i>
	<i>NR2D</i>		<i>KA-2</i>			
	<i>NR3A</i>					
	<i>NR3B</i>					
Mode	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Na}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{G}_q/\text{G}_{11} \rightarrow \uparrow \text{PLC}$	$\text{G}_i/\text{G}_o \rightarrow \downarrow \text{AC}$	
Action	$\text{Na}^+$	$(\text{Ca}^{2+})$	$(\text{Ca}^{2+})$			

### 1.4.2.1 RÉCEPTEURS IONOTROPIQUES

Le premier groupe de récepteurs sensibles au glutamate, nommé récepteurs ionotropiques (iGluR) est divisé en trois familles. Ces trois familles ont été nommées à l'origine selon les agonistes les activant spécifiquement. Il s'agit des récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazolepropionique acid (AMPA), N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et 2-carboxy-3-carboxyméthyl-4-isopropényl-pyrrolidine (kainate). L'homologie de séquence entre les trois familles de iGluRs se situe entre 20 et 30% mais ils partagent cependant des caractéristiques structurales similaires (Kew et Kemp, 2005). Notamment, suite à sa libération, le glutamate active les trois familles de récepteurs en induisant un changement de conformation similaire permettant l'ouverture du canal transmembranaire et la dépolarisation du neurone. Les propriétés cinétiques, de conductance et de modulation diffèrent cependant d'une famille à l'autre permettant la diversité d'action du glutamate sur les neurones. Ils partagent toutefois la propriété de générer des courants excitateurs relativement rapides (Nakanishi, 1992) par rapport à leurs homologues de type métabotropiques qui feront l'objet de la section 1.4.2.2.

#### 1.4.2.1.1 Récepteurs AMPA

On désigne souvent les récepteurs AMPA et kainate comme récepteurs non-NMDA du à l'absence d'agoniste ou d'antagoniste permettant de les discriminer clairement (Heath et Shaw, 2002). Il a fallu le développement du clonage moléculaire pour permettre leur distinction définitive et démontrer leur appartenance à deux familles différentes. Cette section se consacre à la caractérisation des récepteurs de type AMPA.

Le récepteur AMPA est un récepteur canal perméable aux cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ainsi qu'au calcium et au zinc sous certaines conditions. Il est composé de quatre sous-unités (GluR1-GluR4) étant le produit de gènes différents (Rosenmund et al., 1998). Chaque sous-unité est constituée d'un domaine extracellulaire N-terminal, d'un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un



domaine intracellulaire C-terminal, de trois domaines transmembranaires et d'une boucle-pore (Kubo et Ito, 2004). La composition du récepteur AMPA en tétramères permet la création de différents récepteurs AMPA dont les propriétés, notamment de perméabilité et de trafic, varient selon leur composition. Par exemple, les récepteurs comprenant la sous-unité GluR2 sont très faiblement perméables au calcium comparativement aux récepteurs ne possédant pas cette sous-unité (Hollmann et al., 1991). Cette propriété particulière des sous-unités GluR2 est le résultat d'une modification d'édition de son ARN changeant la glutamine (Q) en arginine (R) dans la région du pore (Sommer et al., 1991). Une seconde édition peut survenir au niveau du segment extracellulaire S2 situé entre les domaines transmembranaires trois et quatre et affecte la cinétique de désensibilisation du récepteur. Dans le cas présent, l'édition survient par le changement de l'acide aminé arginine (R) en glycine (G) (Dingledine et al., 1999).

Les récepteurs AMPA exempts de la sous-unité GluR2 (perméables au calcium) génèrent un courant ayant des cinétiques rapides et dont la courbe courant/voltage démontre de la rectification entrante. Pour leur part, les récepteurs AMPA imperméables au calcium, démontrent une courbe courant/voltage linéaire (Verdoorn et al., 1991). L'absence de l'arginine chargé positivement, dans le pore des récepteurs AMPA sans sous-unité GluR2, permet l'association voltage-dépendante de polyamines intracellulaires. Cette association est responsable des différences observées dans les cinétiques des récepteurs AMPA (Donevan et Rogawski, 1995).

Un second niveau de complexité est introduit par l'épissage alternatif de la région S2. En effet, l'épissage génère deux variantes distinctes des sous-unités AMPA nommés Flip et Flop (Sommer et al., 1990). Les niveaux d'expression de ces deux variantes change avec le développement. Flip étant principalement exprimé au cours de la vie prénatale alors que l'expression de Flop s'élève avec la vie postnatale afin d'égaliser ceux de Flip chez l'adulte (Monyer et al., 1994). L'expression de l'une ou l'autre des variantes modifie notamment le niveau de désensibilisation du récepteur. La forme Flip désensibilise plus lentement et à un moindre degré que la variante Flop (Dingledine et al., 1999).

Finalement, les différences dans la région C-terminale des variantes de GluRs permettent un ciblage différentiel de protéines intracellulaires générant une diversité d'activité supplémentaire du récepteur AMPA. Les modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation et la glycolysation du récepteurs AMPA apportent aussi un dernier ajout à la diversité d'action du glutamate sur les propriétés de conductance et de perméabilité des récepteur AMPA.

Une autre particularité des récepteurs AMPA concerne leur trafic synaptique et la conséquente implication de ce trafic sur la transmission synaptique. En l'absence d'activité neuronale les récepteurs AMPA plasmiques sont recyclés de manière constitutive de la synapse au cytosol via des mécanismes d'exocytose et d'endocytose (Ehlers, 2000). Les récepteurs AMPA seraient insérés aux sites extra-synaptiques à partir desquels ils se déplaceraient latéralement vers les sites synaptiques (Borgdorff et Choquet, 2002). Parallèlement, l'endocytose des récepteurs AMPA se ferait à partir des sites extra-synaptiques suite à leur migration à partir de la zone synaptique (Ashby et al., 2004). Des évidences démontrent que l'activité synaptique dicterait les conditions d'insertion ou de retrait des récepteurs AMPA. Selon certains paramètres d'activité synaptique, notamment l'activation des récepteurs NMDA et l'entrée de calcium, l'insertion des récepteurs AMPA serait priorisée menant en une augmentation de la force synaptique (Lu et al., 2001; Passafaro et al., 2001; Park et al., 2004). Sous des conditions de stimulation différentes, l'endocytose des récepteurs serait cette fois favorisée générant une diminution de la force synaptique (Heynen et al., 2000). Un fait intéressant à noter est que l'insertion et la résorption des récepteurs AMPA ne se fait pas de manière aléatoire. En effet, l'induction de la PLT (voir section 1.6.1) à la synapse CA3-CA1, favorise l'insertion des récepteurs AMPA, contenant les sous-unités GluR1 tandis que la résorption observée pendant la DLT (voir section 1.6.2) ferait diminuer le ratio des sous-unités GluR2 (Shi et al., 2001).

En résumé, les mécanismes énumérés ci-contre jouent un rôle crucial dans les mécanismes de modulation, de signalisation et de plasticité synaptique. Les récepteurs AMPA sont les principaux transducteurs de neurotransmission excitatrice rapide dans le SNC et sont la cible de nombreuses voies de signalisation régulant

l'excitabilité des synapses et leur plasticité. Ainsi les propriétés de trafic, de gating, de perméabilité et de stabilisation dépendent grandement des sous-unités composant le récepteur. En conclusion, plusieurs mécanismes distincts contribuent à la complexité, la diversité et la modulation des effets de l'activation des récepteurs AMPA sur l'efficacité et la plasticité synaptique.

#### **1.4.2.1.2 Récepteurs Kainate**

La seconde famille de récepteurs souvent regroupé sous le terme récepteur non-NMDA est constituée des récepteurs kainate. Ces derniers ne sont pas aussi bien décrits que leur homologues AMPA bien que certaines de leurs caractéristiques structurales et électrophysiologiques soient connues.

Les récepteurs kainate sont constitués des sous-unités de basse affinité GluR5-7 et de haute affinité KA1-2 qui se combinent en tétramères pour former une structure très similaire aux autres iGluRs. Comme pour les récepteurs AMPA, plusieurs mécanismes, dont l'épissage alternatif, permettent la création de plusieurs variantes de sous-unités notamment pour les sous-unités GluR5 et 7. Bien que les sous-unités des récepteurs kainate partagent une homologie assez flagrante avec les sous-unités des récepteurs AMPA, ces dernières ne s'associent pas entre-elles. De plus, il a aussi été démontré que les récepteurs kainate possèdent des propriétés cinétiques, d'affinité au ligand, de désensibilisation et de conductance qui leur sont propres (Lambolez et al., 1991; Burnashev et al., 1996; Swanson et al., 1996; Swanson et al., 1998; Smith et al., 2000). Enfin, tout comme les récepteurs AMPA, les récepteurs kainate sont sujets aux modifications post-transcriptionnelles dont l'édition et l'épissage alternatif (Bettler et Mulle, 1995; Jaskolski et al., 2005). Cette dernière modification produit plusieurs variantes de sous-unités: GluR5-1, 2 et GluR5 a-d, GluR6 a-c et GluR7 a et b (Bettler et al., 1990; Sommer et al., 1992; Gregor et al., 1993; Schiffer et al., 1997; Barbon et al., 2001). Cependant, seulement les modifications affectant la portion N-terminale de la sous-unité GluR5 induisent des changements dans l'activité du récepteur (Schiffer et al., 1997). L'épissage des autres sous-unités, qui se fait dans la portion C-terminal, affecte plutôt le trafic et la

régulation du récepteur ainsi que ses interactions avec les protéines intracellulaires (Schiffer et al., 1997; Jaskolski et al., 2004; Coussen et al., 2005). La perméabilité au calcium des récepteurs kainate est déterminée en partie par l'édition au site Q/R où la présence de l'arginine réduit la perméabilité calcique (Burnashev et al., 1995). De plus, tout comme les récepteurs AMPA, le courant produit par les récepteurs non-édités démontrent une rectification entrante comparativement à la courbe courant/voltage linéaire des récepteurs ayant subi l'édition (Bowie et Mayer, 1995). Une fois de plus cette caractéristique serait le produit des polyamines intracellulaires.

D'un point de vue fonctionnel, la présence de récepteurs kainate est maintenant établie tant au niveau postsynaptique que présynaptique et les évidences suggèrent qu'ils sont impliqués dans la transmission synaptique et la modulation de l'efficacité synaptique (Pinheiro et Mulle, 2006). Les propriétés cinétiques plus lentes du courant qu'ils génèrent, comparativement aux récepteurs AMPA, et l'absence du blocage magnésium à des potentiels plus bas, comparativement aux récepteurs NMDA (voir section 1.4.2.1.3), permettent de les distinguer des autres iGluRs. Bien que la physiologie des récepteurs kainate demeure peu connue encore à l'heure actuelle, l'intérêt que porte la recherche à l'étude des caractéristiques et implications de ce récepteur dans la physiologie neuronale est grandissant.

#### 1.4.2.1.3 Récepteurs NMDA

La seconde classe de récepteurs incluse dans la superfamille de récepteurs ionotropes au glutamate est constituée du récepteur *N*-methyl-D-aspartate (NMDA). Le courant NMDA possède des propriétés cinétiques d'activation et de désactivation lentes comparativement à ses homologues non-NMDA et contrairement aux récepteurs AMPA et kainate, les récepteurs NMDA sont toujours perméables au calcium.

Le récepteur NMDA est formé par l'assemblage de différentes sous-unités permettant la génération de plusieurs variantes du récepteur dont les propriétés

électrophysiologiques et les patrons de distribution varient selon les sous-unités le constituant (Yamakura et Shimoji, 1999). Les sous-unités sont classées en trois sous-types : NR1, NR2 et NR3. Le sous-type NR1 regroupe huit différentes formes générées par épissage alternatif d'un gène unique. Les sous-types NR2 (A, B, C et D) et NR3 (A et B) sont pour leur part générés à partir de six gènes différents (Dunah et al., 1999). Afin que l'assemblage des sous-unités génère un récepteur NMDA fonctionnel, il doit inclure obligatoirement une sous-unité NR1 et une sous-unité NR2. La stœchiométrie du récepteur n'est pas déterminée de manière définitive mais il est accepté que la structure du récepteur soit tétramérique et inclue deux sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2 de même ou de différents sous-types (Sasaki et al., 2002). Bien que les différentes sous-unités soient le produit de gènes différents, leur topologie est très semblable. Effectivement, elles possèdent toutes un large domaine extracellulaire N-terminal, trois segments transmembranaires (TM1,3 et 4), une boucle ré-entrante formant le pore (M2), une boucle extracellulaire entre TM3 et TM4 et une portion C-terminale de longueur variée (Dingledine et al., 1999; Sasaki et al., 2002).

Le récepteur NMDA possède plusieurs caractéristiques le différenciant des autres récepteurs canaux. Premièrement, l'activation du récepteur NMDA nécessite la présence de deux co-agonistes soit le glutamate et la glycine (ou la D-serine) et leur liaison aux sous-unités NR2 et NR1 respectivement (Kuryatov et al., 1994; Wafford et al., 1995; Hirai et al., 1996; Laube et al., 1997; Anson et al., 1998; Kew et al., 2000). Les études électrophysiologiques démontrent que deux sites de liaison à la glycine et deux sites de liaison au glutamate doivent être comblés afin d'activer le récepteur. La seconde particularité des récepteurs NMDA réside dans ses caractéristiques de perméabilité. En effet, les récepteurs NMDA sont fortement perméables au calcium, propriété dont les implications pour les neurones les exprimant, sont multiples. La troisième caractéristique particulière des récepteurs NMDA réside dans sa dépendance au voltage. Non seulement l'activité du récepteur dépend de la présence de ses agonistes (glutamate et glycine), mais elle dépend aussi du niveau de dépolarisation du neurone. Cette dépendance est le résultat du blocage

du récepteur par le magnésium plutôt qu'à une modification de la conformation du récepteur lui-même (Nowak et al., 1984; Jahr et Stevens, 1990b, a). Au potentiel de repos la liaison du magnésium avec le pore du récepteur bloque le passage des ions calciques plaçant ainsi le récepteur dans un état inhibé. Une forte dépolarisation, notamment causée par l'activation des récepteurs AMPA, est nécessaire afin d'induire le déplacement du magnésium et permettre au courant NMDA de s'exprimer (revu par (Dunah et al., 1999). Cette entrée de calcium dans la cellule permet l'expression d'une multitude de cascades intracellulaires calcium-dépendantes activant une variété de phosphatases et de kinases.

Les caractéristiques particulières des récepteurs NMDA, notamment sa perméabilité au calcium, permettent d'anticiper leur contribution dans les mécanismes de signalisation et de plasticité synaptique. Effectivement, la perméabilité calcique des récepteurs NMDA leur confère un rôle de premier plan dans l'établissement de plusieurs phénomènes de plasticité synaptiques brièvement décrits à la section 1.6. Bien que les récepteurs NMDA soient capables de générer des signaux électriques, un de leur rôle principal serait plutôt de permettre l'accumulation de calcium nécessaire aux mécanismes de transduction ainsi que d'augmenter la probabilité de coïncidence d'événements synaptiques convergents dû à la nature lente du courant qu'ils génèrent. Ainsi, tout comme les récepteurs AMPA et kainate, les récepteurs NMDA constituent un élément clef de la neurotransmission glutamatergique. La multitude de pathologies impliquant des dysfonctions du récepteur NMDA, incluant l'épilepsie, le Parkinson, l'Alzheimer, la chorée d'Huntington et la sclérose amyotrophique latérale, démontre le rôle central des récepteurs NMDA dans la physiologie neuronale (Hugon et al., 1996).

#### 1.4.2.2 RÉCEPTEURS MÉTABOTROPES

La seconde classe de récepteurs au glutamate est constituée des récepteurs métabotropes lesquels, contrairement aux récepteurs ionotropes, sont couplés à des effecteurs intracellulaires via des protéines G. La découverte des mGluRs dans les

années 1980 a dramatiquement changé la vision traditionnelle de la neurotransmission glutamatergique. En effet, cette facette de la neurotransmission glutamatergique fournit un mécanisme permettant au glutamate de moduler plus finement l'activité synaptique. La distribution hétérogène et la diversité des mGluRs leur confèrent des rôles répartis sur un large éventail d'activités.

#### **1.4.2.2.1 Classes de récepteurs métabotropes au glutamate**

Tout comme leurs homologues ionotropiques, la famille des mGluRs possède plusieurs membres dont les fonctions diffèrent. Il existe huit types de mGluRs différents rassemblés en trois groupes basés sur leur homologie de séquence et sur les mécanismes intracellulaires qu'ils activent: mGluRI, II, III. Le groupe mGluR I regroupe les mGluRs 1 et 5, le groupe II, les mGluRs 2 et 3 et le groupe III les mGluRs 4,6 et 8 (Conn et Pin, 1997). Les membres des trois groupes de mGluRs partagent tous grossièrement la même structure, bien qu'ils soient le produit de gènes différents. Ils possèdent tous une boucle extracellulaire N-terminale très longue, sept segments transmembranaires séparés par de courtes boucles ainsi qu'une région C-terminale de longueur variable. Le site de liaison au glutamate se retrouve sur le segment N-terminal lequel se replie afin de former des domaines globulaires sous-tendus par une région charnière. La région des mGluRs responsable de la spécificité de couplage entre les protéines G et leur effecteurs se retrouve au sein de la deuxième boucle intracellulaire (Pin et al., 1994; Gomeza et al., 1996) bien que toutes les boucles semblent jouer un rôle dans le couplage et l'activation des protéines G. La liaison du glutamate à la surface extracellulaire du récepteur est traduite aux boucles intracellulaires, essentielles au couplage des protéines G, par des modifications de leur conformation. Suite à la liaison du glutamate, les deux lobes de la région N-terminale se referment provoquant la stabilisation des deux domaines transmembranaires dans une conformation active (Kunishima et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002; Jingami et al., 2003). À l'exception des mGluR6, qui se retrouvent uniquement au niveau de la rétine, (Nakajima et al., 1993), tous les sous-types de mGluRs se retrouvent dispersés dans le SNC et le SNP

tant sur les neurones que les cellules gliales (Walker et al., 2001). Les conséquences de l'activation des différents mGluRs peuvent être regroupées en catégories correspondant au groupement des récepteurs selon leur homologie de séquence.

#### 1.4.2.2.1.1 Récepteurs métabotropes au glutamate de type I

Le groupe I est constitué des mGluR1 et 5. Certaines différences existent dans les caractéristiques des mGluR1 et 5 et qui varient notamment selon le lieu d'expression et le développement. Les décrire séparément nécessiterait une foule de détails rendant la lecture de cette revue de littérature ardue. Ainsi, dans cette section de la thèse les caractéristiques des mGluRs seront décrites sans regard à leur appartenance aux sous-groupes 1 et 5 mais plutôt comme appartenant au groupe mGluRI. Il n'en demeure pas moins que certains auteurs traitent spécifiquement et séparément de ces deux sous-groupes (voir (Anwyl, 1999).

Les mGluRI sont couplés positivement à la PLC via  $G\alpha_{q/11}$ . L'activation des protéines G stimule la production de DAG et d'IP3 conduisant à une libération de calcium des réserves intracellulaires (Abdul-Ghani et al., 1996). L'activation de mGluRs I stimule aussi la protéine kinase C (Gasparini et al., 2002), module les canaux calciques voltage dépendant de type L et N (Sayer et al., 1992) et inhibe les conductances potassiques (Gerber et Gahwiler, 1994). Les mGluRs I activent aussi d'autres protéines G incluant  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_{i/o}$  (Aramori et Nakanishi, 1992; Francesconi et Duvoisin, 2000). De plus, les mGluR1 peuvent stimuler la formation de l'AMPc, la libération de l'acide arachidonique (Francesconi and Duvoisin, 2000) et peuvent activer plusieurs effecteurs intracellulaires sans l'intermédiaire des protéines G probablement en passant par Src (Heuss et al., 1999). Ainsi les mGluRs I peuvent déclencher une panoplie de cascades de signalisation. La particularité des mGluRI demeure cependant leur implication dans la signalisation calcique intracellulaire. Les mGluRs I sont présents dans une foule de structures du SNC notamment dans le cervelet, thalamus, l'hippocampe et le cortex. Les niveaux d'expression des mGluR1 et 5 est cependant différentiel parmi ces régions. De plus, bien que les



mGluRs I se retrouvent au niveau présynaptique, ils se concentrent principalement sur les neurones postsynaptiques au niveau des régions extra-synaptiques.

#### 1.4.2.2.1.2 Récepteurs métabotropes au glutamate de type II et III

Le groupe II est constitué des mGluRs 2 et 3 tandis que le groupe III comprend les mGluRs 4, 6, 7 et 8. La distinction majeure entre les mGluRs I et les mGluRs II et III est le couplage de ces derniers avec les protéines  $G_i/G_o$ . Ainsi, l'activation des mGluRs de ces deux groupes mène à l'inhibition de l'adénylate cyclase et de la formation de l'AMPc ainsi que l'activation de la PKA (Anwyl, 1999; Schoepp et al., 1999; Neugebauer, 2001; Gasparini et al., 2002; Knopfel et Grandes, 2002). Comparativement au mGluRs I qui se concentrent principalement sur les neurones postsynaptiques les récepteurs des groupes II et III sont prédominants sur les terminaison présynaptiques d'où ils peuvent réguler la transmission synaptique (Cartmell et Schoepp, 2000). L'effet de l'activation des différents mGluRs varie selon le lieu de leur expression et la gamme d'effets qu'ils produisent est très large et diversifiée. Compte tenu de l'hétérogénéité d'action des mGluRs, il est difficile de décrire leurs effets synaptiques en les classant par groupe. Ainsi leurs effets seront décrits selon leur cible d'action.

#### 1.4.2.2.2 Les cibles des mGluRs

Les cibles de l'activation des mGluRs, les plus étudiées dans la littérature soit les canaux calciques, potassiques, et les récepteurs AMPA et NMDA seront décrites dans cette prochaine section. Les conséquences physiologiques de la modulation des mGluRs sur les canaux ioniques sont très variées. En règle générale, les effets des mGluRs sur les canaux dépendent de la polarité de l'effet des mGluRs (activation ou inhibition), de la nature de l'ion transporté (anion ou cation) ainsi que la localisation synaptique de la cible (pré ou postsynaptique).

#### 1.4.2.2.1 Canaux calciques

Il a été démontré que les trois groupes de mGluRs sont capables d'inhiber les courants calciques et ce dans plusieurs régions du SNC (Sahara et Westbrook, 1993; Swartz, 1993; Stefani et al., 1994; Anwyl, 1999; Cartmell et Schoepp, 2000). L'effet principal de l'activation des mGluRs, notamment du groupe I, est l'inhibition des canaux calciques de type N, L et P/Q localisés sur les neurones postsynaptiques. L'une des caractéristiques particulières de l'inhibition des canaux de type N réside dans son mécanisme d'action qui n'impliquerait pas de messenger diffusible intracellulaire. Les protéines G interagiraient directement avec les canaux calciques (Swartz et Bean, 1992; McCool et al., 1996). Ainsi, il a été proposé dans ce cas que la protéine  $G_i$  médierait l'effet classique sur l'adénylate cyclase alors que la protéine  $G_o$  serait responsable de l'effet direct sur le canal calcique (Anwyl, 1999). L'inhibition des canaux calciques de type L et P/Q nécessite pour sa part l'implication de messagers intracellulaires bien que l'identité de ces effecteurs demeure inconnue (Anwyl, 1999). Non seulement les mGluRs peuvent inhiber les courants calciques mais certaines études démontrent que sous certaines conditions et à certaines synapses, ils peuvent occasionnellement potentialiser les canaux calciques activés par de hauts voltages (HVA) (Rothe et al., 1994). Bien que la majorité des études décrivent les effets de l'activation des mGluRs sur les canaux calciques postsynaptiques, quelques unes démontrent maintenant une contribution des mGluRs sur la modulation des canaux calciques présynaptiques (Takahashi et al., 1996). Le calcium étant l'un des messagers intracellulaires les plus importants, la participation des mGluRs à la gestion du calcium permet donc d'affecter un large spectre d'activités au sein des cellules.

#### 1.4.2.2.2 Canaux potassiques

Les canaux potassiques sont aussi l'une des principales cibles connues des mGluRs. Effectivement, les mGluRs peuvent inhiber l'activité d'une grande diversité de canaux potassiques incluant les canaux potassiques calcium-dépendant

de type lent  $I_{K(AHP)}$  (Davies et al., 1995; Abdul-Ghani et al., 1996), les canaux potassiques voltage dépendants s'inactivant lentement ( $I_{K(M)}$ ), le courant de fuite ( $I_{leak}$ ), les canaux de rectification entrante activés par les protéines G (GIRK) et les courants potassiques lents indépendants du calcium  $I_{K(slow)}$  (Anwyl, 1999). La majorité des études a démontré la participation des mGluRs de groupe I dans les effets sur les courants potassiques. Contrairement aux canaux calciques de type N, l'effet de l'activation des mGluRs sur l'inhibition des canaux potassiques dépend de messagers intracellulaires bien qu'encore une fois leur nature demeure ambiguë.

Non seulement les mGluRs peuvent inhiber les canaux potassiques, ils peuvent aussi y être occasionnellement couplés positivement. En effet, ils peuvent activer les conductances des canaux potassiques dépendants du calcium de basse, intermédiaire et de haute conductance au calcium ( $I_C$ ,  $I_{K(Ca)}$ ), les GIRK et les  $I_{K^+ (leak)}$  (Anwyl, 1999). L'action des mGluRs sur les conductances potassiques permet de modifier le potentiel des neurones et donc de modifier leurs propriétés synaptiques.

#### 1.4.2.2.2.3 Récepteurs canaux AMPA, NMDA et kainate

Comme mentionné aux sections précédentes les récepteurs canaux ont une grande importance dans la physiologie glutamatergique. Il est donc intéressant de noter que les mGluRs sont capables de moduler leur activité. De manière générale, ils augmentent l'activité des récepteurs NMDA, AMPA et kainate via la phosphorylation (Anwyl, 1999; Neugebauer, 2002). Effectivement, les mGluRs de groupe I régulent l'activité de protéines (PKC, PKA, ERK//MAP kinase et tyrosine kinase) capables de phosphoryler les récepteurs NMDA, AMPA stimulant leur activité (Neugebauer, 2002). Toutefois, certaines données démontrent que les mGluRs peuvent, sous certaines conditions, réguler à la baisse l'activité des récepteurs NMDA. Cet effet serait plutôt limité à la membrane et donc ne nécessiterait pas l'intermédiaire de messagers intracellulaires (Anwyl, 1999). Ainsi les mGluRs sont non seulement capables de moduler à la hausse ou à la baisse la neurotransmission glutamatergique par leurs effets sur les canaux ioniques mais

aussi par leur effet sur les récepteurs ionotropiques lesquels sont responsables de l'effet rapide du glutamate à la synapse.

#### 1.4.2.2.4 Réserves calciques intracellulaires

Les concentrations intracellulaires de calcium peuvent être augmentées dans le cytoplasme neuronal de deux manières différentes. Premièrement par l'influx calcique provenant du milieu extracellulaire et pénétrant dans les cellules par l'intermédiaire de canaux perméables au calcium et deuxièmement par la mobilisation du calcium provenant des réserves intracellulaires. Comparativement aux récepteurs ionotropiques, qui induisent des élévations calciques par l'intermédiaire de canaux, les mGluRs les induisent non seulement en agissant sur les canaux (voir section 1.4.2.2.1.) mais aussi par l'intermédiaire des réserves internes (Fagni et al., 2000). En effet, les mGluRs sont aussi capables d'augmenter les concentrations intracellulaires de calcium par la stimulation des réserves sensibles à l' $IP_3$  et les réserves sensibles à la ryanodine. L'activation des mGluRs de groupe I, par l'intermédiaire des protéines G et la phospholipase C, permet la production de l' $IP_3$  et la sortie de calcium des réserves sensibles à l' $IP_3$  (Nicoletti et al., 1986; Finch et Augustine, 1998). Les réserves calciques sensibles à la ryanodine peuvent aussi être recrutées suite à l'activation des mGluRs de groupe I (Chavis et al., 1996). Le recrutement des réserves calciques sensibles à la ryanodine peut se faire de deux manières différentes. En effet, l'augmentation des niveaux de calcium causée par l'activation des récepteurs à l' $IP_3$  peut premièrement induire indirectement la relâche de calcium des réserves à la ryanodine par le mécanisme de "calcium-induced calcium release" (CICR) (Simpson et al., 1995; Berridge, 1998). D'autre part, la stimulation des mGluRs peut conduire à l'activation des récepteurs à la ryanodine (RyR) via une interaction physique fonctionnelle avec la protéine Homer (Brakeman et al., 1997). Cette interaction permet de créer un lien physique entre les RyRs et les mGluRs. Une relation étroite existe donc entre les mGluRs et les réserves intracellulaires de calcium.

#### 1.4.2.2.3 Implication des mGluRs dans la transmission synaptique

Comme mentionné aux sections précédentes, les mGluRs affectent une panoplie de canaux, récepteurs canaux et effecteurs intracellulaires. La localisation pré ou postsynaptique des mGluRs permet de moduler de manière différentielle les propriétés synaptiques. Effectivement, lorsque les mGluRs sont localisés sur les neurones postsynaptiques ils peuvent, en modifiant les canaux calciques et potassiques, AMPA et NMDA, affecter l'activité des neurones. Par exemple, l'activation des mGluRs peut, sous certaines conditions, générer des potentiels postsynaptiques excitateurs ou inhibiteurs qui se développent lentement (Congar et al., 1997). Bien que les mécanismes impliqués dans la genèse de ce courant mGluR soient hétérogènes et encore incertains, ils semblent impliquer les canaux sodiques et potassiques. Le rôle synaptique de ces IPSCs et EPSCs serait de modifier les concentrations ioniques du neurone postsynaptique et conséquemment affecter les paramètres de la transmission synaptique.

L'activation des mGluRs localisés sur le compartiment présynaptique aurait, pour sa part, comme conséquence de moduler la libération de glutamate. En effet, en agissant comme autorécepteur, ces mGluRs, principalement de groupe II et III, conduiraient à une inhibition présynaptique. Cependant, la difficulté attribuée aux enregistrements dans les terminaisons présynaptiques rend l'étude des mécanismes impliqués très complexe. Quelques lignes directrices établissent toutefois un rôle des canaux calciques et potassiques ainsi qu'une inhibition de l'exocytose dans ce phénomène (revu par (Conn et Pin, 1997).

Les mGluRs peuvent aussi servir d'hétérorécepteurs aux synapses gabaergiques. Dans ce cas, les évidences démontrent que les mGluRs agissant comme hétérorécepteurs diminuent la libération de GABA aux synapses inhibitrices. Ainsi, les récepteurs mGluRs présynaptiques serviraient, en règle générale, à diminuer la libération de neurotransmetteur. Il existe toutefois quelques évidences démontrant un rôle des mGluRs dans la facilitation présynaptique bien que ce phénomène demeure très peu étudié (Conn et Pin, 1997).

Comme mentionné à la section **1.4.2.2.1**, les mGluRs (groupes I, II et III) se retrouvent aussi sur les cellules gliales. Cette position particulière des mGluRs à la synapse leur permet de moduler de manière indirecte la transmission synaptique. En effet, des études ont démontré que l'activation des mGluRs astrocytaires induit des élévations calciques (Porter et McCarthy, 1996) lesquelles sont impliquées, à certaines synapses, dans la libération du gliotransmetteur glutamate. La libération du glutamate par les astrocytes affecte en retour la transmission synaptique (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b). Ainsi, les mGluRs, lorsque localisés sur les neurones pré et postsynaptiques modulent directement la synapse en agissant sur les cascades de messagers seconds (protéine kinase, phosphatase et protéines impliquées dans l'exocytose) ainsi que sur les paramètres essentiels à la transmission synaptique (conductance calciques, potassique et récepteurs AMPA et NMDA). Pour leur part, les mGluRs localisés sur les cellules gliales agissent de manière indirecte sur la synapse.

#### **1.4.2.2.4 Implication des mGluRs dans la plasticité synaptique**

Les mGluRs sont aussi impliqués dans les mécanismes menant aux changements de l'activité synaptique à long terme discutés à la section (**1.6.1 et 1.6.2**). Effectivement, les mGluRs sont notamment impliqués dans l'induction de la PLT au niveau de la synapse CA3/CA1 de l'hippocampe (Otani et Ben-Ari, 1991) ainsi que dans la DLT au niveau du cervelet, de l'hippocampe, du striatum et du cortex visuel. Les mGluRs sont aussi impliqués, à certaines synapses et dans certaines conditions, dans la plasticité synaptique à court terme dont la facilitation et la dépression comme décrit à la section **1.6.3 et 1.6.4** (Rush et al., 2002).

#### **1.4.2.2.5 Modulation de l'activité des mGluRs**

L'ampleur et la diversité d'action des mGluRs, décrites aux sections précédentes, permet d'anticiper l'importance de la mise en place de systèmes de

régulation contrôlant leur activité. Il existe principalement deux paliers de régulation des mGluRs soit au niveau des protéines G et au niveau du récepteur comme tel.

Premièrement, une modulation peut se faire au niveau des protéines G par l'intermédiaire de protéines nommées RGS (regulators of G protein signaling). La liaison des RGS avec les sous-unités  $\alpha$  des protéines G accélère leur activité GTPasique et donc la signalisation de ces dernières vers les effecteurs intracellulaires (Dohlman et Thorner, 1997; Siderovski et al., 1999). L'activation des messagers seconds intracellulaires dont la calmoduline kinase II et les GRK (G-protein coupled receptor kinase), suite à la stimulation répétée, permettent de leur côté de diminuer l'activité des mGluRs.

Deuxièmement, la régulation peut se faire au niveau du récepteur ou par la désensibilisation et elle implique alors la phosphorylation, la liaison avec la  $\beta$ -arrestin et l'internalisation (Krupnick et Benovic, 1998; Ferguson, 2001). Le modèle accepté pour l'internalisation des mGluRs implique la phosphorylation du récepteur par des GRK, ce qui stimule la liaison de la  $\beta$ -arrestin causant un découplage du récepteur avec ses protéines G (Dale et al., 2001). L'ajout de la  $\beta$ -arrestin favorise la liaison du récepteur avec les protéines impliquées dans l'endocytose et le recrutement des molécules de clathrine et de  $\beta$ 2-adaptine. Suite à leur internalisation, les récepteurs sont déphosphorylés dans les compartiments endosomaux et recyclés à la membrane ou détruits par les lysosomes (Dhami et Ferguson, 2006). La désensibilisation des mGluRs peut être homologue (dépendante de la stimulation répétée par l'agoniste) ou hétérologue (indépendante de l'agoniste). Ainsi, plusieurs mécanismes sont mis en place dans les cellules afin de réguler leur activité et les conséquences de leur activation.

#### **1.4.2.2.6 Régulation et interactions avec d'autres protéines**

La liaison des mGluRs avec des protéines intracellulaires n'a pas comme unique rôle de réguler son activité. En effet, les mGluRs peuvent interagir avec des

protéines du cytosquelette, notamment la tubuline, afin de localiser les mGluRs à la membrane (Ciruela et al., 1999). Les protéines contenant un domaine PDZ interagissent avec la portion C-terminal de certains mGluRs. En effet, les protéines contenant le domaine PDZ (95 kDa postsynaptic density protein (PSD-95)/ZO-1) interagissent avec les GluRs contenant un motif de liaison PDZ (Sheng et Sala, 2001). La protéine PICK1, par exemple lie le mGluR7 modulant ainsi son expression et sa phosphorylation (Boudin et al., 2000). La protéine tamaline pour sa part lie le récepteur mGluR1 et régule son expression à la surface des cellules (Kitano et al., 2002). Finalement, les protéines de la famille Homer lient la portion C-terminale des mGluR contrôlant leur expression et leur activité constitutive (Ango et al., 2001).

D'autres voies de signalisation impliquant les mGluRs ont aussi été démontrées au cours des dernières années. Notamment, la voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) qui, suite à l'activation des mGluRs mènerait à l'activation de certains gènes précoces agissant comme facteurs de transcription (Peavy et Conn, 1998; Ferraguti et al., 1999). Ainsi, en incluant les protéines mentionnées à la section précédente, on observe que l'activité des mGluRs peut être modulée à de nombreux niveaux permettant une régulation fine de leur activité et d'élargir le spectre de leurs actions sur les neurones.

### **1.4.3 TRANSPORTEURS AU GLUTAMATE**

Les récepteurs au glutamate ne sont pas les seules protéines synaptiques sensibles au glutamate. En effet, les protéines de transport du glutamate, que l'on retrouve aux synapses glutamatergiques, possèdent aussi cette caractéristique. Il existe principalement deux groupes de protéines capables de transporter le glutamate au travers des membranes. Il y a les transporteurs plasmiques, constitués de protéines localisées sur les membranes plasmiques et dont la fonction physiologique est de réguler les concentrations extra-synaptiques de glutamate. Il y a ensuite les transporteurs intracellulaires localisés sur les membranes vésiculaires. Ces



transporteurs sont nommés VGLUT (vesicular glutamate transporter) et ont comme rôle premier d'empaqueter le glutamate dans les vésicules synaptiques.

#### **1.4.3.1 TRANSPORTEURS PLASMIQUES**

Comme mentionné à la section 1.4.1, le bon fonctionnement de la transmission glutamatergique dépend de la clairance rapide du glutamate de la fente synaptique. L'accumulation de glutamate dans la fente synaptique aurait comme conséquence d'augmenter le ratio signal-bruit et de générer de l'excitotoxicité (Tapia, 1996). Compte tenu qu'aucune enzyme connue ne permet la dégradation significative du glutamate extracellulaire, la clairance du glutamate est l'entière responsabilité des transporteurs membranaires (Balcar et Johnston, 1972; Logan et Snyder, 1972; Danbolt, 2001). L'efficacité des systèmes de transport est telle qu'ils parviennent à maintenir une concentration de glutamate extracellulaire de 1-3  $\mu\text{M}$  dans la fente synaptique et de produire un gradient de concentration de l'ordre de plusieurs milliers de part et d'autre des membranes (Trotti et al., 1998). Il existe trois principales classes de transporteurs plasmiques, soit les transporteurs de haute affinité, les transporteurs de basse affinité et les transporteurs au glutamate indépendants du sodium.

#### **1.4.3.2 TRANSPORTEURS DE BASSE AFFINITÉ ET INDÉPENDANTS DU SODIUM.**

Il existe principalement deux classes de transporteurs de basse affinité pour le glutamate. Le premier étant le système de transport essentiellement indépendant du sodium et qui aurait comme but de fournir des acides aminés aux cellules nerveuses à des fins métaboliques (Erecinska et Silver, 1990).

La deuxième classe est un système de transport à basse affinité pour le glutamate et qui aurait comme rôle premier d'échanger de la cystine contre du glutamate en utilisant le gradient de concentration de glutamate de part et d'autre de la membrane plasmique (Bannai, 1986). Les fonctions et les caractéristiques de ces

différentes classes de transporteurs de basse affinité sont peu étudiées comparativement aux transporteurs de haute affinité.

#### **1.4.3.3 TRANSPORTEURS DE HAUTE AFFINITÉ.**

Les transporteurs de haute affinité nommés EAATs (excitatory amino acid transporters) sont regroupés en six classes dont les propriétés et localisations (neuronale ou gliale) à la synapse diffèrent selon le groupe auquel ils appartiennent. Ces cinq classes sont : EAAT1 (Glast), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAATC), EAAT4 et EAAT5 (Saier, 1999). Bien qu'il existe des différences entre les groupes, ils possèdent des caractéristiques communes. Notamment, tous les transporteurs de haute affinité sont électrogéniques, c'est-à-dire qu'ils génèrent un gradient de part et d'autre de la membrane pouvant être évalué par la mesure des courants qu'ils génèrent (Nicholls et Attwell, 1990). En effet, le transport du glutamate se fait en parallèle avec deux ou trois ions de sodium et un proton en échange d'un ion de potassium (revu par Danbolt, 2001). Ainsi, le transporteur utilise l'énergie libre emmagasinée dans le gradient de concentration des ions sodiques et potassiques pour faire pénétrer le glutamate et un proton à l'intérieur des cellules (Nicholls et Attwell, 1990). Pour leur part, les différences dans les propriétés spécifiques existant entre les différents groupes demeurent limitées par le manque de molécules capables de les bloquer spécifiquement. On sait cependant que certains transporteurs seraient capables de transporter du chlore et de générer un courant chlorique dont l'intensité serait différente selon la classe de transporteur (Arriza et al., 1997). En effet, la liaison du glutamate au transporteur stimulerait l'ouverture du canal chlore et l'entrée de l'ion dans la cellule. Le rôle physiologique de cette conductance chlorique dépendante du glutamate est inconnu mais certains s'entendent pour dire qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'excitabilité et la signalisation neuronale. L'utilisation plus récente des approches génétiques permet progressivement de déterminer le rôle spécifique des différents groupes de EAAT. Par exemple, de nouvelles études utilisant des souris dont le gène pour EAAT-1 a été désactivé, démontrent que ces dernières subissent des crises épileptiques

spontanées létales causées probablement par l'accumulation de glutamate à la synapse (Tanaka et al., 1997). Par contre, lorsque le transporteur EAAT2 est désactivé par des manipulations génétiques, les conséquences neurotoxiques et comportementales observées sont mineures. Les propriétés des EAATs seront conséquemment discutées non pas par une description des caractéristiques propres aux différents groupes, lesquelles sont donc peu connues, mais selon leur localisation à la synapse.

#### **1.4.3.3.1 Localisation des transporteurs de haute affinité**

La localisation et les fonctions des transporteurs varient selon le groupe auquel ils appartiennent. Par exemple, les transporteurs EAAT-1 et EAAT-2 sont principalement gliaux et seraient spécialement responsables de la clairance du glutamate du milieu extracellulaire (Rothstein et al., 1996). Pour leur part, les EAAT3 et 4 seraient principalement neuronaux bien que la localisation subcellulaire de ces derniers demeure controversée. En effet, leur localisation sur les terminaisons synaptiques et les axones des neurones excitateurs est remise en question par des études démontrant que les transporteurs EAAT3 et EAAT4 seraient plutôt localisés sur les corps cellulaires des neurones et les dendrites (Dehnes et al., 1998). Ces études localiseraient plutôt les transporteurs EAAT3-4 sur les régions neuronales en contact avec le tissu glial (Danbolt, 2001). Le rôle de ces transporteurs serait, comparativement aux transporteur gliaux, de contrôler la quantité de glutamate qui s'échappe de la synapse et de contrôler le niveau d'activation des récepteurs métabotropes présynaptiques (Amara et Fontana, 2002). De plus, il a été démontré que l'inhibition spécifique de ces transporteurs neuronaux provoque une diminution de la transmission synaptique suggérant un rôle de ces derniers dans le contrôle rétroactif de la libération de glutamate par l'activation excessive des mGluR présynaptiques (Maki et al., 1994). Non seulement la localisation des transporteurs à la synapse est fonction du groupe auquel ils appartiennent, leur distribution varie aussi selon la région du SNC. Par exemple, les EAAT3 se retrouvent principalement au niveau de l'hippocampe, du cervelet et des ganglions de la base (Conti et al.,

1998; Kugler et Schmitt, 1999) alors que les EATT4 se retrouvent principalement dans les épines dendritiques des cellules de Purkinje du cervelet (Yamada et al., 1996). Finalement, les EAAT5 seraient absents du SNC mais abonderaient dans la rétine (Arriza et al., 1997).

#### **1.4.3.3.2 Structure des transporteurs de haute affinité.**

Les transporteurs au glutamate sont formés d'un polypeptide de 500 à 600 acides aminés dont l'homologie de séquence varie de 50-60% entre les différents groupes de transporteurs (Arriza et al., 1993). La protéine s'insère à la membrane par 6 à 8 segments transmembranaires de telle façon que les extrémités N et C-terminales se retrouvent dans le milieu intracellulaire (Seal et al., 2000; Kanner et al., 2001; Kanner et Borre, 2002). Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que les acides aminés responsables de la liaison du sodium, du potassium ou du glutamate sont localisés dans la portion C-terminal du sixième domaine transmembranaire (Seal et al., 2000; Kanner et al., 2001), région hautement conservée parmi les EAATs. De plus, les EAATs, sont capables, encore grâce à leur portion C-terminale, de faire des liaisons avec d'autres protéines au niveau de la membrane plasmique. La liaison des EAATs avec ces protéines influence les événements synaptiques. En effet, ces protéines contrôlent l'expression et la localisation spécifique des transporteurs à la membrane (Shigeri et al., 2004). Quelques-unes de ces protéines, nommées GTRAP (glutamate transporter-associated protein) ont été identifiées et certaines auraient comme rôle de stabiliser les transporteurs à la membrane (Jackson et al., 2001).

#### **1.4.3.3.3 Modulation de l'activité des transporteurs de haute affinité.**

Il est maintenant connu que l'activité de recapture du glutamate par les EAATs n'est pas constante et qu'elle est régulée non seulement pendant le développement mais aussi chez l'adulte. Cette modulation peut se faire au niveau de

la transcription, de l'épissage, de la synthèse protéique, du ciblage des protéines à la membrane et par des modifications post-traductionnelles (Gegelashvili et Schousboe, 1998). Ces modulations sont sous l'influence d'une multitude de facteurs directs ou indirects. Les facteurs indirects capables de moduler l'activité du transporteur sont notamment la présence d'un gradient électrochimique et d'un potentiel membranaire adéquat au bon fonctionnement de la protéine. Parmi les interactions directes avec les EAATs, on note l'activation des mGluRs, iGluRs, certaines kinases (PKC, PKA et  $PI_3K$ ) ou le glutamate auraient comme conséquences de moduler à la hausse ou à la baisse l'activité de recapture (Gegelashvili et al., 2000). Finalement, la présence de certaines molécules dans le milieu extracellulaire, notamment, l'acide arachidonique (Zerangue et al., 1995) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (Berry et al., 2005) permet de moduler la fonction des transporteurs. Elles agiraient soit directement sur la protéine elle-même ou indirectement en affectant d'autres protéines ou substances signalisatrices agissant sur le transporteur (Danbolt, 2001).

#### 1.4.3.4 TRANSPORTEURS VÉSICULAIRES.

Comme mentionné à la section 1.4.3, il existe une deuxième classe de transporteurs au glutamate lesquels sont localisés sur les membranes des vésicules synaptiques. Les scientifiques ont longtemps cherché à découvrir la protéine responsable de l'accumulation de glutamate dans les vésicules synaptiques mais cette dernière est demeurée indétectable pendant de nombreuses années. Quand enfin la protéine fut identifiée, les chercheurs réalisèrent que cette protéine avait déjà été identifiée et clonée de nombreuses années auparavant. En effet, la protéine connue sous le nom de BNP1 (brain-specific  $Na^+$ -dependent inorganic phosphate transporter-1) fut par la suite renommée VGLUT1. La découverte de VGLUT1 a stimulé la recherche à découvrir d'autres transporteurs similaires et ayant les mêmes fonctions, si bien que l'on connaît aujourd'hui trois isoformes du transporteur soit : VGLUT1, 2 et 3. Les trois différents sous-types transportent le glutamate dans les vésicules synaptiques à l'aide d'un gradient électrochimique. Ce gradient

électrochimique est créé par l'intermédiaire d'une pompe  $H^+$ -ATPase qui accumule les protons au sein des vésicules permettant d'utiliser le potentiel énergétique ainsi accumulé afin de concentrer le glutamate dans les vésicules synaptiques (Shigeri et al., 2004; Takamori, 2006). L'efficacité des transporteurs vésiculaires est telle que certains suggèrent que seulement un transporteur par vésicule serait nécessaire pour concentrer suffisamment le glutamate (Daniels et al., 2006).

#### **1.4.3.4.1 Différences entre les isoformes VGLUT1, 2 et 3**

Des études récentes se sont penchées sur les particularités des différentes isoformes, cependant aucune différence majeure ne semble exister entre elles. Effectivement, elles possèdent pratiquement les mêmes propriétés de transport et leur séquence d'acides aminés est homologue à 90% (Takamori, 2006). Les quelques distinctions répertoriées seraient causées par les différences dans les portions cytoplasmiques N et C-terminales et qui permettraient des interactions spécifiques avec des protéines différentes. Les VGLUT1, par exemple, possèdent une région C-terminale riche en proline qui leur est spécifique et qui permet une interaction avec des protéines possédant un domaine SH3 (Src-homology domain 3) (Vinatier et al., 2006). Il se pourrait ainsi que des différences fonctionnelles existent entre les différentes isoformes lesquelles seraient causées par des interactions protéine-protéine engageant les portions cytoplasmiques spécifiques N et C-terminales des différentes isoformes (Takamori, 2006).

Des différences majeures existent cependant dans la distribution des isoformes au sein du SNC. En effet, la distribution des isoformes est pratiquement exclusive et complémentaire. Les premières études d'immunohistochimie ont démontré que la distribution de VGLUT1 et VGLUT2 dans le cerveau de rat adulte est complémentaire avec seulement très peu de superposition (Freneau et al., 2001; Fujiyama et al., 2001; Herzog et al., 2001). Notamment, VGLUT1 est exprimé dans les cortex cérébral et cérébelleux ainsi qu'au niveau de l'hippocampe tandis que le VGLUT2 est principalement détecté dans le diencéphale et le rhombencéphale

(Freneau et al., 2001; Kaneko et al., 2002; Li et al., 2003a). La troisième isoforme VGLUT3 possède un patron de distribution plus limité et est souvent colocalisée avec des marqueurs pour les neurones gabaergiques, sérotoninergiques et cholinergiques (Freneau et al., 2002; Gras et al., 2002; Schafer et al., 2002). Cette dernière observation laisse entendre que les neurones VGLUT3 positifs seraient capables de co-transmission avec un neurotransmetteur classique (voir section 1.7).

#### **1.4.3.4.2 Régulation des VGLUTs**

Le bon fonctionnement de la transmission synaptique dépend en grande partie de la capacité des neurones à emballer le glutamate dans les vésicules. Conséquemment, tous les facteurs influençant l'activité des VGLUTs sont susceptibles d'influencer la transmission synaptique. Parmi les facteurs agissant sur les VGLUTs, on retrouve le phosphate et la PAG (phosphate activated glutaminase) lesquels stimulent l'accumulation de glutamate dans les vésicules. Les facteurs agissant sur l'activité de la  $H^+$ -ATPase peuvent aussi modifier la capacité d'emmagasinage du glutamate en agissant sur la force électromotrice. D'autres facteurs sont aussi capables de moduler l'activité des VGLUT par interaction directe avec la protéine. Notamment, l'IPF (inhibitory protein factor) qui inhibe l'accumulation VGLUT-dépendante de glutamate. Ainsi, de nombreux efforts restent cependant à faire afin de mieux comprendre les facteurs capables de réguler l'expression et l'activité des VGLUTs.

#### **1.4.3.4.3 Recyclage des VGLUTs**

La présence des VGLUTs sur les membranes vésiculaires sous-tend que lors de l'exocytose, ces protéines sont perdues aux dépens de la membrane plasmique. Les vésicules synaptiques sont évidemment régénérées par endocytose (Heuser et Reese, 1973; Murthy et De Camilli, 2003) mais les mécanismes impliqués dans le recyclage des protéines vésiculaires demeurent vagues. Des études ont toutefois

démontré que lors du recyclage de VGLUT1, ce dernier interagit avec la protéine endophiline via sa portion C-terminale riche en proline (Voglmaier et al., 2006). L'endophiline est partie intégrante de la machinerie endocytotique dépendante de la clathrine et aurait comme rôle de donner la courbure aux vésicules lors de l'invagination (Farsad et al., 2001; Gallop et al., 2005) et de permettre le recrutement d'autres protéines (Schuske et al., 2003; Verstreken et al., 2003). Le recrutement de l'endophiline par les VGLUTs procure ainsi un mécanisme efficace pour assurer que toutes les vésicules contiennent au moins une molécule VGLUT. Par ailleurs, des études ont aussi démontré qu'en l'absence de cette interaction entre VGLUT et l'endophiline, le recyclage vésiculaire persiste mais au ralenti. Ils ont démontré que le recyclage peut aussi se faire par l'intermédiaire d'une deuxième voie d'endocytose impliquant l'AP3 (brefeldin A (BFA)-sensitive adaptor) (Faundez et al., 1998; Voglmaier et al., 2006). Il existerait ainsi deux voies de recyclage complémentaires des VGLUT soit par la voie impliquant l'endophiline et permettant un recyclage rapide et via la voie plus lente impliquant l'AP3 (Voglmaier et al., 2006). Ces deux voies distinctes d'endocytose pourraient diriger les vésicules vers différentes réserves vésiculaires au sein de la terminaison nerveuse (Voglmaier et Edwards, 2007). Le recyclage des VGLUTs est donc non seulement un mécanisme économique pour les cellules mais pourrait aussi permettre de générer des vésicules ayant des propriétés potentiellement différentes.

#### **1.4.4 TRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE À LA JNM**

Le glutamate, considéré comme neurotransmetteur exciteur par excellence du SNC, se retrouve aussi au niveau du SNP. En effet, il se retrouve principalement aux JNM d'invertébrés où il est responsable de la transmission neuromusculaire en agissant comme neurotransmetteur exciteur causant la contraction musculaire. La JNM de mammifère est, pour sa part, classiquement considérée comme une jonction purement cholinergique. En effet, l'application d'antagonistes des récepteurs nicotiques abolie complètement les potentiels postsynaptiques et conséquemment la contraction musculaire. Néanmoins, depuis le milieu des années 1990, des



observations supportent la présence d'éléments impliqués dans la transmission glutamatergique. En effet, le glutamate est présent dans les terminaisons motoneuronales en association avec des vésicules synaptiques (Waerhaug et Ottersen, 1993). Certaines observations vont plus loin et démontrent même une co-libération du glutamate avec l'acétylcholine dans des préparations de synaptosomes (Vyas et Bradford, 1987). La présence de récepteurs du type NMDA a aussi été démontrée aux JNMs pendant le développement (Fu et al., 1995; Liou et al., 1996; Fu et al., 1998) ainsi qu'à la JNM adulte (Berger et al., 1995; Urazaev et al., 1995; Grozdanovic et Gossrau, 1998; Todd et al., 2004). Des observations démontrent également que l'activation de ces récepteurs glutamatergique affecterait la libération quantique aux JNMs de *Xenopus* en développement (Liou et al., 1996) ou non-quantique aux JNMs de rats adultes (Malomouzh et al., 2003). Les études semblent toutefois contradictoires quant à la localisation des récepteurs glutamatergiques à la synapse. Certaines études les placent sur le compartiment présynaptique tandis que d'autres les placent sur les cellules musculaires. Par ailleurs, des études récentes démontrent la présence de transporteurs vésiculaires (VGLUT) (Boulland et al., 2004) ainsi qu'un système de transporteur au glutamate (GLAST et GLT) (Rinholm et al., 2007a). La présence inattendue d'une machinerie glutamatergique à la JNM de vertébré n'est plus débattue, cependant le rôle du glutamate dans la transmission et la plasticité synaptique de la JNM demeure ambigu. Effectivement, aucune donnée électrophysiologique ne démontre une action directe du glutamate sur la physiologie musculaire. Des potentiels glutamatergiques ont été enregistrés uniquement au niveau de la synapse entre les motoneurones et les cellules de Renshaw (Nishimaru et al., 2005). Aucune étude n'a donc permis de démontrer, hors de tout doute, l'implication du glutamate comme neurotransmetteur, neuromodulateur ou même gliotransmetteur à la JNM de vertébré bien que toutes les évidences semblent pointer dans cette direction.

## 1.5 NEUROTRANSMISSION NITRINERGIQUE

Bien que le glutamate soit considéré comme le neurotransmetteur exciteur par excellence du SNC, d'autres molécules sont aussi utilisées comme neuromodulateurs excitateurs dans le SN. C'est notamment le cas de l'oxyde nitrique (NO). Toutefois, comparativement au glutamate, le NO possède des caractéristiques synaptiques considérées comme atypiques. Selon le principe de Dale, une molécule est considérée comme neurotransmetteur si elle possède une série de critères dont : (1) La présence d'une réserve du transmetteur dans la terminaison axonale. (2) La molécule doit être libérée suite à la stimulation nerveuse. (3) L'application exogène du transmetteur doit reproduire l'effet de la stimulation nerveuse. (4) Finalement, les drogues qui modifient l'effet du neurotransmetteur doivent agir en produisant l'effet correspondant. Bien que tous les critères énoncés dans le principe de Dale ne s'appliquent pas à la neurotransmission nitrinergique, il n'en demeure pas moins que les effets du NO sur les fonctions neuronales sont aujourd'hui incontestés.

La production de NO par les neurones a été observée pour la première fois en 1988 par Garthwaite et collaborateurs (Garthwaite et al., 1988). Ils ont démontré alors que la stimulation de tranches de cervelet en culture, à l'aide d'acides aminés excitateurs, stimule la libération d'une substance dont les propriétés ressemblaient à celles du facteur relaxant d'origine endothélial (EDRF) identifié quelques années auparavant (Griffith et al., 1984). La démonstration définitive de l'implication du NO dans la signalisation neuronale fut établie l'année suivante par le même groupe de chercheurs. En effet, ces derniers ont démontré que l'inhibition de l'enzyme de synthèse du NO bloque la stimulation de la GMPc associée à l'activation des récepteurs NMDA. Depuis, plusieurs groupes de recherche ont cloné, caractérisé et déterminé l'implication du NO dans de nombreux autres phénomènes neuronaux.

Plusieurs caractéristiques font du NO un messenger inhabituel. En effet, par comparaison avec les neurotransmetteurs traditionnels libérés de manière vésiculaire et dont le domaine d'action est limité à la fente synaptique, le NO ne peut être stocké dû à sa nature instable et diffusible (il peut atteindre 100µm (Wood et Garthwaite,

1994; Schweighofer et Ferriol, 2000; Prast et Philippu, 2001)). Le NO est donc synthétisé de manière simultanée et diffuse ensuite au travers des membranes pour affecter diverses protéines cibles. Ainsi, la régulation de la production du NO peut uniquement se produire au niveau de sa biosynthèse d'où l'importance de bien comprendre les mécanismes impliqués dans sa synthèse ainsi que la régulation des enzymes et cofacteurs impliqués.

### **1.5.1 BIOSYNTHÈSE DU NO**

Compte tenu de la nature instable (demi-vie de moins d'une seconde (Beckman et Koppenol, 1996)) et diffusible du NO, l'étude de ses caractéristiques physiologiques et de son implication dans les phénomènes biologiques ont été fournies en grande partie grâce à l'étude de sa biosynthèse. Il existe deux voies de synthèse du NO soit : par voie enzymatique, via l'oxyde nitrique synthase (NOS), ou à partir des réserves S-nitrosothiol.

#### **1.5.1.1 BIOSYNTHÈSE DÉPENDANTE DE LA NOS**

La production NOS-dépendante de NO est sans aucun doute la voie de synthèse du NO la plus étudiée. Bien que le nombre de phénomènes physiologiques auxquels elle est associée ne fasse qu'augmenter, les mécanismes et réactions chimiques exactes impliqués dans sa formation demeurent malheureusement pour la plupart inconnus.

##### **1.5.1.1.1 Mécanismes de la synthèse NOS-dépendante de NO**

Le clonage et la caractérisation des isoformes de la NOS ont démontré l'existence de trois type de NOS : la neuronale (Bredt & Snyder 1990; Bredt et al. 1991), l'endothéliale (Fostermann et al. 1991; Pollock et al. 1991) et celle retrouvée dans les macrophages (Hevel et al. 1991; Stuehr et al. 1991) et ont amené une

nouvelle nomenclature. En effet, l'on parle maintenant fréquemment des isoformes NOS1, NOS2 et NOS3 pour désigner la forme neuronale, inductible et endothéliale respectivement. Cependant l'ancienne nomenclature sera utilisée dans cette section.

Les trois isoformes de NOS sont toutes cytosoliques et de poids moléculaire variant de 135 à 160 KD. Elles sont formées de deux domaines fonctionnels soit le domaine réductase N-terminal, contenant les séquences de liaison aux donneurs d'électrons NADPH, FAD et FMN, et le groupement hème C-terminal, contenant le fer et le site de liaison du cofacteur H<sub>4</sub>B (Guengerich, 1991; Degtyarenko et Archakov, 1993). Le groupement réductase (contenant le NADPH, FAD et FMN) permet le transport des électrons du NADPH jusqu'au groupement hème (contenant le fer) et la réduction d'une molécule d'oxygène (O<sub>2</sub>). Cette étape de la réaction enzymatique, catalysée par la NOS, est nécessaire afin de convertir l'acide aminé L-arginine en L-citrulline + NO (Moncada et Higgs, 1993). La production de NO par cette voie enzymatique nécessite donc la présence d'une molécule d'oxygène (O<sub>2</sub>) et de donneurs d'électrons. Les cofacteurs tétrahydrobiopterin (H<sub>4</sub>B) et calmoduline sont aussi indispensables à la formation enzymatique du NO (Southan et Szabo, 1996). En effet, la calmoduline est essentielle au transport des électrons tandis que le H<sub>4</sub>B est requis aux fins de réduction de l'oxygène moléculaire. La NOS possède aussi de nombreux sites de phosphorylation (PKA, PKC et CaMK) dont les fonctions seront étudiées plus en détails à la section 1.5.1.1.3.2. Suite à la production de NO, la L-citrulline est métabolisée et hydrolysée afin de régénérer les stocks de L-arginine (Kemp et Woodbury, 1965; Sadasivudu et Rao, 1976). Il est intéressant de noter que les cellules contenant la NOS ont une grande capacité d'accumuler la L-arginine extracellulaire grâce à des transporteurs dont l'activité est proportionnelle à l'activité de la NOS (Bogle et al., 1992; Westergaard et al., 1993). Bien que les mécanismes mentionnés ci-haut soient universels à toutes les isoformes connues de NOS, il existe des différences entre chacune d'elles leur conférant ainsi des caractéristiques propres.

### 1.5.1.1.2 Isoformes de NOS

Les différentes isoformes sont le produit de gènes distincts possédant une homologie de séquence de 50-60%. Elles partagent ainsi des propriétés chimiques et enzymatiques mais possèdent des propriétés catalytiques et régulatrices distinctes. Les différences principales entre les isoformes sont la sensibilité au calcium, le mode d'expression (constitutif ou inductible) et le locus d'expression de l'enzyme. Les modèles d'ablation et de surexpression génique ont permis au cours des dernières années d'étudier distinctement le rôle des différentes isoformes de NOS. Les prochaines sections résument les propriétés communes et individuelles aux différentes isoformes mises à jour notamment grâce à ces modèles d'étude.

#### 1.5.1.1.2.1 La forme endothéliale (eNOS) (NOS3)

L'isoforme endothéliale (eNOS) se retrouve majoritairement dans le système cardio-vasculaire où son expression est accrue dans l'endothélium vasculaire. La eNOS joue conséquemment un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire. Elle est aussi exprimée par d'autres types cellulaires notamment les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Dinerman et al., 1994; Kantor et al., 1996) et les plaquettes sanguines.

Les deux caractéristiques principales de la eNOS sont sa grande sensibilité au calcium et son expression constitutive dans les cellules au repos, ce qui la différencie de la iNOS (voir 1.5.1.1.2.2). Au niveau cellulaire, la eNOS est associée à des renflements de la membrane plasmique appelés cavéolae caractérisés par la présence d'une protéine de support transmembranaire, la cavéoline. Au niveau de ces renflements, la fluidité membranaire est diminuée par une forte teneur en cholestérol et sphingolipides permettant l'accumulation de plusieurs protéines dont celles impliquées dans la signalisation de eNOS. L'interaction protéine-protéine entre la cavéoline et eNOS inhibe cependant l'activité enzymatique de cette dernière de manière réversible en masquant son site de liaison avec la calmoduline. Or, l'activité basale de la eNOS est atténuée par sa liaison avec la cavéoline (Dudzinski

et al., 2006). L'activité maximale de la eNOS est conséquemment atteinte uniquement lorsque les niveaux de calcium sont suffisants pour promouvoir la liaison de la calmoduline (Venema et al., 1997). Ainsi, la majorité des voies de signalisation menant à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium module l'activité de la eNOS. Par exemple, l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) qui stimule la PLC et la mobilisation du calcium module l'activité de eNOS. Subséquemment, l'ACh (via l'activation des récepteurs muscariniques de type 2), l'adénosine, l'ATP, l'histamine et la bradykinine activent la eNOS. De très belles expériences ont pu démontrer le développement de vagues calciques à l'intérieur des cavéola suite à l'activation de GPCR (Isshiki et al., 1998). Le calcium n'est pas l'unique activateur de la eNOS. En effet, la phosphorylation de la sérine 1177 par la kinase Akt peut aussi mener à l'activation de eNOS. Considérant la forte présence de eNOS au niveau des cellules endothéliales vasculaire, il n'est pas surprenant d'apprendre que les défauts d'expression de eNOS causent des pathologies reliées au système cardio-vasculaire dont l'artériosclérose.

#### 1.5.1.1.2.2 La forme inductible (macNOS) (NOS2) (iNOS)

La forme inductible de la NOS (iNOS) se retrouve principalement au niveau des cellules du système immunitaire dont les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les hépatocytes. Comme son nom l'indique, son expression est inductible et est exprimée uniquement suite à une stimulation par des agents immunogènes et/ou inflammatoires (LPS, interféron- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-1) (Stuehr et Marletta, 1985; Lorsbach et al., 1993). La régulation de l'expression de iNOS est sous contrôle de promoteurs situés en 5' du gène qui comportent des régions régulatrices contenant des sites de liaison pour des interleukines, LPS et autres agents immunogènes (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993). Contrairement aux formes constitutives (nNOS et eNOS), iNOS possède la capacité de produire du NO même en absence de calcium. En effet, le complexe calmoduline-calcium interagit fortement de manière non-covalente avec son site de liaison sur la iNOS laissant cette dernière toniquement active (Yuan et al., 1998; Yuan et al., 1999).

Conséquemment, une fois l'expression de iNOS stimulée par les agents immunologiques, les cellules produisent le NO de façon non régulée par les niveaux de calcium intracellulaires. La régulation de l'enzyme se fait plutôt au niveau de l'accessibilité à des quantités suffisantes de substrats et de cofacteurs notamment H<sub>4</sub>B. Lorsque ces derniers viennent à manquer, la iNOS se met à produire le superoxyde (O<sup>2-</sup>) hautement toxique pour les cellules. Cette dernière caractéristique explique le rôle de iNOS dans les cellules immunitaires au cours des défenses contre les cellules d'origine tumorales ou microbiennes (Xia et Zweier, 1997).

#### 1.5.1.1.2.3 La forme neuronale (nNOS) (NOS1)

La forme neuronale partage plusieurs caractéristiques avec la forme endothéliale dont la sensibilité au calcium et son expression constitutive. Bien que majoritairement retrouvée dans les neurones autant centraux que périphériques, elle est aussi présente dans quelques autres types cellulaires non-neuronaux dont les cellules rénales de la macula densa (Wilcox et Welch, 1998) et les cellules musculaires squelettiques (Nakane et al., 1993). Le patron d'expression de nNOS est compliqué par la présence de plusieurs isoformes d'ARNm provenant de l'épissage alternatif menant à la production de quatre protéines différentes (Wang et al., 1999) dont les propriétés sont distinctes. En effet, un premier groupe, nNOS<sub>α</sub> (nNOS pleine longueur) et nNOS<sub>μ</sub> sont localisés à la membrane grâce à des domaines PDZ. Cette propriété permet la liaison de nNOS aux protéines PSD95 et PSD93 permettant de cibler la nNOS aux sites synaptiques. De plus, sachant que la protéine PSD95 lie aussi le récepteur NMDA, la présence de domaines PDZ sur ces isoformes de nNOS permet de coupler l'activité du récepteur NMDA et l'entrée de calcium à la nNOS (Christopherson et al., 1999). Une association semblable existe aussi entre la nNOS et la α 1 syntrophine musculaire. Il existe aussi des différences entre nNOS<sub>α</sub> et nNOS<sub>μ</sub> et ce principalement au niveau de leur localisation. En effet, nNOS<sub>μ</sub> se retrouve spécifiquement dans les cellules musculaires cardiaques ainsi que les muscles squelettiques (Silvagno et al., 1996). Pour leur part, les deux autres

isoformes, nNOS $\beta$  et nNOS $\gamma$ , ne possèdent pas de domaine PDZ et ne sont donc pas associées aux membranes synaptiques (Brenman et al., 1996). Ces deux isoformes possèdent des différences d'activités marquées. En effet, les activités enzymatiques de nNOS $\beta$  et nNOS $\gamma$  sont inférieures à l'activité de nNOS $\alpha$  (Eliasson et al., 1997). Les quatre isoformes sont impliquées dans plusieurs phénomènes physiologiques neuronaux dont la libération de neurotransmetteurs, la plasticité, le développement neuronal et la régénération (voir section 1.5.3).

#### 1.5.1.1.3 Sites de régulation de la NOS

Les différentes isoformes de NOS sont exprimées dans de nombreux tissus et l'éventail de ses activités est très large. Ainsi, la régulation de son activité est cruciale au bon fonctionnement cellulaire et la NOS est l'une des enzymes connues les plus strictement régulées. En effet, la NOS peut être régulée à plusieurs niveaux. Toutes les isoformes de NOS sont régulées au niveau de leur transcription, de leur activité, de leur expression et de leur localisation par des interactions protéine-protéine, par épissage alternatif ou par des modifications covalentes.

##### 1.5.1.1.3.1 Modulation transcriptionnelle.

Bien que la régulation transcriptionnelle de iNOS par les agents immunogènes est largement connue, la régulation de l'expression de nNOS et eNOS demeure un sujet équivoque. Un nombre croissant d'études démontrent maintenant une régulation à la hausse de l'ARNm de nNOS selon les conditions physiologiques ou pathologiques. Les cellules neuronales réagissent au stress induit par une large gamme d'agents chimiques (colchicine, phénobarbitals), physiques (la chaleur, l'exposition à la lumière, la stimulation électrique) et biologiques (neurotransmetteurs et hormones) (Spessert et al., 1995; Lam et al., 1996; Calza et al., 1997; Goldstein et al., 1997; Lumme et al., 1997; Reiser et al., 1997; Sharma et al., 1997; Thompson et al., 1997). Il est intéressant de noter que l'expression de



nNOS est régulée par les changements de l'activité neuronale (Tascedda et al., 1996). Par exemple, l'inhibition de la transmission glutamatergique au niveau des cellules granulaires du cervelet augmente drastiquement l'expression de nNOS (Baader et Schilling, 1996). Comme mentionné à la section 1.5.1.1.2.3, l'épissage alternatif génère quatre isoformes de nNOS dont les propriétés enzymologiques et les patrons de distribution sont distincts.

#### 1.5.1.1.3.2 Modulation de l'activité

Les modulations de l'activité de NOS se font principalement grâce à des modifications post-traductionnelles incluant des interactions avec des protéines ou cofacteurs et grâce à la phosphorylation. Comme mentionné dans les sections précédentes, la calmoduline et le calcium jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de NOS. Le tétrahydrobioptérine et le Heat-shock protein 90 (HSP-90) sont aussi reconnus comme agents stimulant l'activité de NOS. (Garcia-Cardena et al., 1998) La protéine inhibitrice de NOS (PIN) pour sa part régule à la baisse son activité en déstabilisant l'enzyme (Jaffrey et Snyder, 1996). La contribution de PIN est cependant controversée depuis sa description comme étant une chaîne légère de la myosine et de la dynéine (King et al., 1996). En effet, ceci suggère que PIN aurait un rôle à jouer dans le transport axonal de nNOS plutôt qu'un rôle de protéine régulatrice de son activité (Hemmens et al., 1998; Rodriguez-Crespo et al., 1998). La phosphorylation de nNOS par la PKA, PKG, PKC, CaMK et la protéine kinase Akt a aussi été démontrée et les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation sont diverses (Brune et Lapetina, 1991; Nakane et al., 1991; Bredt et al., 1992; Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). En effet, la phosphorylation peut soit affecter directement l'activité de l'enzyme, modifier l'affinité de ses cofacteurs ou modifier sa localisation subcellulaire, ce qui change l'activité de la NOS. Finalement, la disponibilité de la L-arginine et des cofacteurs (NADPH, O<sub>2</sub> et HB<sub>4</sub>) peut aussi modifier l'activité de la NOS en limitant la production de NO.

#### 1.5.1.1.3.3 Modulation de la localisation.

La palmitoylation (ajout d'un acide gras sur les résidus cystéines) et la myristoylation (ajout d'un groupement myristyle sur les résidus glycine) de eNOS permettent son association avec la membrane plasmique (Shaul et al., 1996). L'association de eNOS avec la protéine cavéoline représente aussi une modulation de la localisation de NOS suite à une interaction protéine-protéine. En effet, la liaison de NOS avec cette dernière permet de cibler NOS à la membrane plasmique à proximité des protéines impliquées dans sa signalisation (Garcia-Cardena et al., 1996; Shaul et al., 1996). Finalement, la présence d'un domaine PDZ au sein de certaines isoformes de nNOS cible cette dernière à la synapse précisément au niveau des densités postsynaptiques. Ainsi les modifications post-traductionnelles représentent un autre degré de complexité dans la régulation de l'activité de NOS.

#### 1.5.1.2 RÉSERVES S-NITROSOTHIOL

Bien que la formation enzymatique du NO par la NOS soit universellement acceptée comme mécanisme principal de production de NO, une source NOS-indépendante a aussi été identifiée. En effet, la S-nitrosylation est une modification post-traductionnelle consistant en l'ajout d'un groupement S-nitrosothiol sur les résidus d'acides aminés (généralement de cystéine) de plus d'une centaine de protéines identifiées (Stamler et al., 2001). La nitrosylation de ces protéines module l'activité de ces dernières en modifiant par exemple, leur conformation tridimensionnelle ou leur capacité à former des interactions avec d'autres protéines (Hess et al., 2005). Plusieurs enzymes, dont la superoxyde dismutase (Gow et al., 1999) et la céruloplasmine (Mani et al., 2004), sont reconnues comme facteurs stimulant la S-nitrosylation. Ainsi liés aux protéines, les groupements thiols constituent une réserve de NO laquelle peut être ultérieurement libérée suite à une dé-nitrosylation. Quelques enzymes connues, dont la thiorédoxine réductase (Nikitovic et Holmgren, 1996) et la disulfide isomérase (Sliskovic et al., 2005), stimulent la décomposition des protéines-S-nitrosothiols menant à la libération du

NO. La régulation de la production de NO à partir de ces réserves et l'implication de ces dernières dans les phénomènes physiologiques dont l'activité nerveuse, sont mal compris. Néanmoins une étude récente (Chvanov et al., 2006) démontre une régulation calcium-dépendante de la libération de NO dérivé des S-nitrosothiols. De plus, il a été proposé, au niveau des tranches de cervelet de rats, que l'activation des récepteurs non-NMDA et métabotropes au glutamate peut mener à la production de NO à partir de ces réserves (Okada, 1992; Yamada et Nabeshima, 1998).

## **1.5.2 MÉCANISMES D'ACTION DU NO**

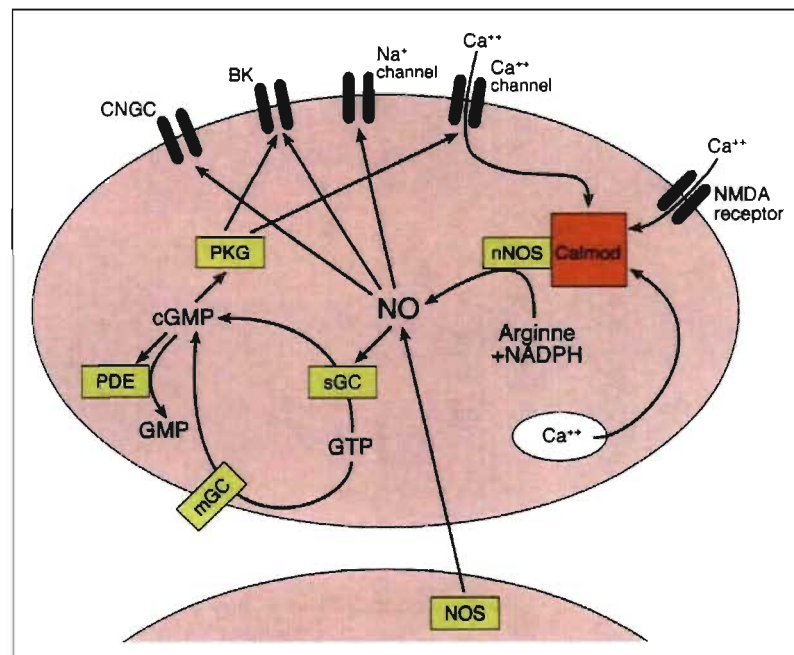
Une fois le NO synthétisé, il étend son territoire d'action aux cellules voisines, grâce à sa propriété de molécule diffusible. Au sein de ces cellules, le NO agit via deux mécanismes d'action distincts. Soit par l'activation de la guanylate cyclase (GMPc-dépendante) ou par des modifications post-traductionnelles de protéines (GMPc-indépendante).

### **1.5.2.1 LA VOIE DE LA GUANYLATE CYCLASE (GMPc-DÉPENDANT)**

Il existe deux types de guanylate cyclase capable de produire le GMPc, soit une forme soluble et activée par le NO et une forme liée aux membranes régulée par les hormones peptidiques (Garbers, 1992). L'attention sera concentrée sur la forme soluble laquelle est sensible au NO et dont les cascades moléculaires impliquées dans son action sont mieux connues et bien décrites. La guanylate cyclase est une enzyme hétérodimérique contenant un groupement hème servant à capter le NO, lequel est nécessaire à son activation (Humbert et al., 1990). En effet, la liaison du NO au groupement prosthétique change la conformation de l'enzyme résultant en une augmentation de l'activité (Gerzer et al., 1981). Le monoxyde de carbone est lui aussi capable de lier le groupement hème mais avec une puissance beaucoup plus faible que le NO. Les deux sous-unités de l'enzyme ( $\alpha$  et  $\beta$ ) catalysent la formation du GMPc à partir du GTP (Pyriochou et Papapetropoulos, 2005). Une fois produit,

le GMPc agit sur trois cibles principales : les protéines kinases G, les canaux régulés par les nucléotides cycliques et les phosphodiesterases (Lincoln et Cornwell, 1993). L'activation de la PKG mène à la phosphorylation de diverses protéines qui peuvent être groupées en 6 catégories selon leurs fonctions (Wang et Robinson, 1997). Soit des protéines impliquées dans la voie de signalisation des nucléotides cycliques, dans la régulation des phosphatases, dans la dynamique du cytosquelette et dans l'homéostasie du calcium intracellulaire en plus d'agir sur des canaux ioniques et des protéines liant le GTP (Wang et Robinson, 1997). Ainsi, l'activation de la PKG permet d'affecter plusieurs phénomènes physiologiques notamment la neurotransmission (Woody et al., 1986; Pineda et al., 1996), la LTP (Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 1995) et l'expression de certains gènes. L'activation des phosphodiesterases mène pour sa part à la phosphorylation de protéines impliquées, entre autre, dans la régulation de canaux calciques (Hartzell et Fischmeister, 1986). Dernièrement, les canaux régulés directement par le GMPc ouvrent davantage l'éventail d'action du NO. Effectivement de nombreux canaux cationiques ou anioniques sont régulés par les niveaux de GMPc cellulaire (revue par (Lincoln et Cornwell, 1993). L'exemple le plus abondamment décrit demeure le canal  $\text{Na}^+$  perméable au calcium des bâtonnets rétiens qui est inactivé par l'hydrolyse du GMPc (Miller, 1982). Les différentes cibles sont résumées à la **figure 8**. La diversité d'action de ces trois cibles de la guanylate cyclase offre une étape supplémentaire de divergence d'effets que peut avoir le NO au niveau cellulaire.

**Figure 7 Les cibles du NO**



Représentation des cibles de l'oxyde nitrique et du GMPc sur une cellule type. Une fois le NO produit par l'une des isoformes de NOS, ce dernier active l'une des deux isoformes de la guanylate cyclase (GC) soit sa forme soluble (sGC) ou sa forme liée aux membranes (mGC). L'activation de cette enzyme permet la conversion du GTP en GMPc. Les cibles du GMPc sont les phosphodiésterases (PDE) ainsi que les canaux activés par les nucléotides (CNGC) et la protéine kinase G (PKG). La PKG affecte pour sa part plusieurs cibles regroupées en 6 catégories dont seulement deux sont illustrées sur ce schéma dont les canaux calciques et potassiques dépendants du calcium (BK).

### 1.5.2.2 MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES (GMPc-INDÉPENDANT)

Le NO peut aussi modifier les protéines par des réactions chimiques directes avec ces dernières résultant en un changement de l'activité de la protéine ciblée. La N-nitrosylation, mentionnée à la section 1.5.1.2, consistant en l'ajout d'un groupement S-nitrosothiol sur les résidus d'acides aminés (généralement de cystéine), en est un exemple. Cette réaction chimique requiert cependant une concentration supérieure de NO et se déroule de manière généralement plus lente. L'éventail de protéines susceptibles d'être nitrosylées est très large (Hess et al.,

2005). Un autre effet du NO consiste en la stimulation de l'ADP-ribosylation de protéines liées aux membranes. L'ADP-ribosylation est le transfert enzymatique de l'ADP-ribose du nicotinamide adénosine diphosphate à une protéine accepteuse (Brune et al., 1994).

### **1.5.3 LES EFFETS DU NO SUR LES NEURONES**

La distribution des neurones utilisant le NO comme messenger fut détaillée bien avant d'en savoir davantage sur les fonctions du NO. Ceci est notamment dû au fait que la NOS possède la capacité de catalyser la réaction NADPH diaphorase facilement détectable en histochimie sur des tissus fixés. Ainsi, le patron d'expression des cellules positives pour la NOS a rapidement démontré une très large distribution parmi les neurones du système nerveux central et périphérique. L'une des conséquences de cette vaste distribution est la diversité des effets du NO à la synapse, ce qui fera l'objet de la prochaine section (1.5.3.1). Il est toutefois approprié de noter que le NO engendre aussi plusieurs activités non-synaptiques sur les neurones. En effet, des études ont démontré que le NO est notamment impliqué dans la survie (Akassoglou, 2005) et l'apoptose des neurones (Kang et al., 2004) et qu'il participe à la croissance des neurites (Bicker, 2005). De plus, l'expression de certains gènes est sous contrôle du NO (Dempfle, 1999).

#### **1.5.3.1 LE RÔLE DU NO SUR LA LIBÉRATION DE NEUROTRANSMETTEURS.**

Afin de comprendre les mécanismes d'action du NO dans les fonctions synaptiques du SNC, il est capital de comprendre l'interaction qui existe entre le récepteur NMDA et la NOS. En effet, le stimulus principal connu de la synthèse du NO dans le SNC est l'influx de calcium provenant de l'activation des récepteur NMDA (Brenman et Bredt, 1997; Christopherson et al., 1999). Ainsi, le NO peut potentiellement influencer tous les processus neuronaux calcium-dépendant qui utilisent le récepteur NMDA. Comme mentionné à la section 1.5.1.1.2.3, la co-

localisation de la NOS avec le récepteur NMDA est possible grâce à la présence d'un motif PDZ en N-terminal, permettant la séquestration de cette dernière au niveau des densités postsynaptiques contenant aussi le récepteur NMDA. Cette propriété de la NOS de se localiser à la synapse est une caractéristique essentielle à l'établissement de ses fonctions. Il existe aussi d'autres facteurs capables de stimuler la production de NO, notamment l'activation du récepteur métabotrope au glutamate (mGluR) (Bhardwaj et al., 1997b) et le récepteur 2B à la sérotonine (Manivet et al., 2000).

Bien qu'au niveau du SNC l'effet du NO soit généralement potentialisateur, son implication dans la régulation de la transmission synaptique est très variée. Le NO peut augmenter (Meffert et al., 1996) ou diminuer (Thomas et Robitaille, 2001) la libération calcium-dépendante de neurotransmetteurs chez les vertébrés ainsi qu'augmenter la libération calcium-indépendante (Meffert et al., 1994). Le NO peut directement nitrosyler des protéines impliquées dans l'exocytose, agissant conséquemment sur la transmission synaptique (Meffert et al., 1996). Cependant, le rôle le plus étudié du NO dans le SNC demeure son implication comme messenger rétrograde dans certaines formes de potentialisation à long terme (PLT) (voir section 1.6.1). La nature lipophile du NO fait de cette dernière une molécule parfaitement conçue pour transmettre l'information nécessaire à l'induction de la PLT. En effet, les événements cellulaires responsables de l'initiation de la PLT ont lieu dans le neurone postsynaptique alors que les événements responsables de la persistance de la PLT dans le temps se déroulent, du moins en partie, dans le neurone présynaptique (Bennett, 2000). Ceci implique que le neurone postsynaptique doit informer l'élément présynaptique de l'induction de la PLT. Le concept du messenger rétrograde a été introduit il y a une vingtaine d'années (Bliss et al., 1986) et il est désormais établi que le NO est produit en parallèle avec d'autres messagers dont le monoxyde de carbone, l'acide arachidonique et qu'ils agissent de concert pour affecter la PLT (Medina et Izquierdo, 1995).

Au niveau présynaptique le NO augmenterait la libération de neurotransmetteurs par des mécanismes qui sont largement étudiés. Comme mentionné dans la section 1.5.2 les cibles du NO sont très diverses bien qu'elles

aient toutes un point de convergence : le GMPc. Ainsi les effets du NO sur la transmission synaptique sont le reflet de l'activation des différentes voies de signalisation passant notamment par la PKG (Feil et al., 2005). Par exemple, il a été démontré que le NO peut augmenter la vitesse de l'endocytose et du recyclage des vésicules synaptiques (Micheva et al., 2003).

Le NO est aussi impliqué dans un second phénomène de plasticité à l'opposé de la PLT, soit la dépression à long terme (DLT) (voir section 1.6.2). Au niveau du cervelet, une diminution de la force synaptique est observée entre les cellules de Purkinje et les fibres parallèles suite à la stimulation conjointe des fibres parallèles et des fibres grimpantes. Cette dépression est attribuée à la diminution de la sensibilité des récepteur AMPA (Crepel et Krupa, 1988). En effet, l'activation de la guanylate cyclase et la subséquente activation de la PKG par le NO permettrait l'inhibition de la déphosphorylation et le maintien du récepteur AMPA dans son état inhibé (Hartell, 1994). Les cellules de Purkinje sont exemptes de NOS si bien que le NO provient des terminaisons des fibres parallèles. Le NO est aussi un bon candidat pour la dépression hétérosynaptique où son rôle a été démontré notamment au niveau du cervelet de mammifère (Jacoby et al., 2001). Le NO par sa nature diffusible permettrait donc d'atteindre des synapses étant éloignées de la source de sa production et d'y modifier les propriétés synaptiques.

### 1.5.3.2 NEUROTOXICITÉ NITRINERGIQUE

Il arrive cependant que la quantité de NO dans l'entourage des cellules devient telle qu'il se développe un phénomène de neurotoxicité. La toxicité du NO est nécessaire dans le système immunitaire afin de tuer les agents pathogènes et les cellules tumorales. Cependant, sous des conditions particulières, l'action du NO peut être néfaste à l'organisme. Le stimulus principal de la synthèse de NO dans le SNC est l'activation des récepteurs NMDA (Garthwaite, 1991). La suractivité des récepteurs NMDA est impliquée dans plusieurs conditions pathologiques dont l'Alzheimer, la maladie d'Huntington et la sclérose amyotrophique latérale (Choi, 1994). Des expériences menées à l'aide de souris mutantes déficientes pour la NOS



démontrent une résistance à l'ischémie cérébrale ainsi qu'au Parkinson induit par le MPTP (Huang et al., 1994; Przedborski et al., 1996). Cependant, au niveau cardiovasculaire le NO semble protéger contre les lésions ischémiques cérébrales. En effet, les souris dépourvues de eNOS démontrent une plus grande susceptibilité aux lésions probablement par manque de dilatation des vaisseaux sanguins (Huang et al., 1996). Ainsi, le NO synthétisé par les neurones est neurotoxique mais le NO dérivé de la synthèse par eNOS est neuroprotecteur. Les thérapies élaborées afin de contrevenir aux maladies dégénératives ciblent donc la forme neuronale de la NOS afin de ne pas compromettre le flux sanguin cérébral (Hantraye et al., 1996; Zhang et al., 1996).

La toxicité du NO s'exerce en inhibant le cytochrome c oxidase mitochondrial. Le NO inhibe la consommation d'oxygène par les mitochondries limitant ainsi la production d'ATP par la cellule. La réduction du cytochrome par le NO se produit en conditions pathologiques, notamment en cas d'ischémie cérébrale (Mitrovic et al., 1994; Lizasoain et al., 1996). Une seconde conséquence à la réduction du cytochrome est la formation du radical libre superoxide  $O_2^{\cdot-}$  qui stimule plusieurs facteurs de transcription permettant la régulation génique de quelques gènes dont ceux de la glycolyse (Palacios-Callender et al., 2004; Moncada et Bolanos, 2006). De plus, au niveau neuronal, le NO peut induire la libération de calcium et une perte du potentiel membranaire mitochondrial. Ceci conduit ultérieurement au bris de la membrane mitochondriale externe et à la libération de facteurs apoptotiques (Tatton et Olanow, 1999). Finalement, la formation de peroxynitrite par la réaction entre  $O_2^{\cdot-}$  et le NO modifie le fonctionnement de certaines protéines impliquées dans la pathogenèse de maladies neurologiques (Beckman et al., 1990; Lipton et al., 1993; Bonfoco et al., 1995). La formation du peroxynitrite se fait lorsque les concentrations de L-arginine sont sous-optimales, condition dans laquelle la nNOS produit du  $O_2^{\cdot-}$  qui est ainsi libre de réagir avec le NO (Xia et Zweier, 1997). L'appréciation des conséquences d'une mauvaise gestion de la production du NO par les neurones permet de comprendre la mise en place de nombreux sites de régulation de sa production par les cellules (voir section 1.5.1.1.3). Il a été déterminé que tous les neurones du SNC sont situés à au moins quelques

microns d'une source de NO donc susceptibles d'être affectés par une production de NO anarchique.

#### **1.5.4 LIENS ENTRE LA NEUROTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE ET NITRINERGIQUE.**

La colocalisation du récepteur NMDA avec la NOS dans les SNC et SNP est seulement un exemple de la coopération qui peut exister entre le NO et le glutamate. En effet, hormis le récepteur NMDA, l'activation des récepteurs kaïnate (Garthwaite et al., 1989), AMPA (Bhardwaj et al., 1997a) et mGluR (Bhardwaj et al., 1997b) peut aussi mener à la production NOS-dépendante du NO. De plus, le glutamate permet la libération du précurseur L-arginine par les astrocytes stimulant ainsi indirectement la production de NO en rendant la L-arginine disponible pour la synapse (Gensert et Ratan, 2006). À l'inverse, il existe aussi des évidences selon lesquelles le NO module la neurotransmission glutamatergique. Le NO produit suite à l'activation des récepteurs NMDA, permet la S-Nitrosylation et l'activation de la protéine NSF résultant en une stimulation du trafic de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA à la membrane (Huang et al., 2005). Il existe aussi des données démontrant que le NO désensibilise le récepteur NMDA lorsque ce dernier est suractivé (Ferraro et al., 1999) alors qu'il maintiendrait son activation en condition d'activation normale (Oh et al., 1999). Ainsi, ces études démontrent que le NO peut agir en amont de la transmission glutamatergique en régulant à la hausse ou à la baisse l'activité des récepteurs ionotropes impliqués dans l'action du glutamate.

#### **1.5.5 LES CELLULES GLIALES : SOURCE RÉGULÉE DE NO**

Les sections précédentes mentionnent uniquement les neurones comme source de NO. Les cellules gliales possèdent aussi la capacité de le produire. En effet, il est démontré que les cellules gliales possèdent les trois isoformes des NOS

(Murphy, 2000) et sont capables de produire le NO en conditions physiologiques et pathologiques. Les astrocytes, un sous-type de cellules gliales intimement associé à la synapse, sont capable de libérer du NO en réponse à certains neurotransmetteurs (Li et al., 2003b). Les astrocytes répondent à l'activité nerveuse par des élévations de leur taux de calcium intracellulaire appelées vagues calciques (Fiacco et McCarthy, 2006; Scemes et Giaume, 2006). Ces réponses calciques ont plusieurs conséquences sur la cellule. Elles induisent notamment la libération de neurotransmetteurs dont le glutamate (Parpura et al., 1994; Innocenti et al., 2000) qui affectent en retour les neurones adjacents (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994; Hassinger et al., 1995; Pasti et al., 1997; Araque et al., 1998a) et modulent la transmission synaptique (Araque et al., 1998a; Kang et al., 1998; Newman et Zahs, 1998). Il a été démontré que l'élévation calcique gliale, dépendante de l'activité nerveuse, est suffisante pour stimuler la production de NO par les astrocytes en culture (Li et al., 2003b). Les astrocytes semblent donc être capables de répondre à l'activité nerveuse par la production de NO. La capacité du NO d'origine gliale de modifier en retour la transmission synaptique n'a cependant pas été démontrée. De plus, les cellules gliales sont capables de répondre au NO produit par les neurones par des élévations calciques. En effet, les cellules de Bergmann, qui sont une forme spécialisée d'astrocytes retrouvées dans le cervelet, répondent à la stimulation des fibres parallèles par des élévations calciques et cette interaction serait dépendante du NO (Matyash et al., 2001). Ainsi, les cellules de Bergmann sont sensibles au NO d'origine neuronale. Finalement, les cellules gliales sont capables de communiquer entre elles grâce à des signaux intra et extracellulaires qui permettent la genèse de vagues calciques qui se propagent à longue distance au sein du syncytium glial. Parmi les signaux intracellulaires, on retrouve notamment l'IP<sub>3</sub>, qui via sa diffusion au travers des jonctions gap permet le renouvellement des vagues calciques aux cellules voisines (Newman, 2001; Peters et al., 2003). Les signaux extracellulaires, pour leur part, incluent l'ATP et le NO (Willmott et al., 2000; Newman, 2001; Schipke et al., 2002; Peters et al., 2003). La stimulation des cellules gliales induit la libération de l'ATP ou du NO qui diffusent aux cellules gliales voisines afin de produire des réponses calciques qui s'étendent radialement au réseau glial.

L'implication du NO dans la genèse de vagues calciques intercellulaires a donc aussi été démontrée (Willmott et al., 2000).

En résumé, les cellules gliales sont capables de réagir au NO produit par les neurones, de produire du NO susceptible de modifier l'activité neuronale et l'activité des cellules gliales avoisinantes. Finalement, les cellules gliales peuvent affecter la production de NO par les cellules avoisinantes en contrôlant la disponibilité de la L-arginine. En effet, les cellules gliales accumulent le précurseur L-arginine grâce à la présence de systèmes de transport et de recyclage (Wiesinger, 2001). Cette propriété leur permet d'agir comme réservoir de L-arginine. L'inhibition du métabolisme glial par le fluorocitrate mène à la fuite de L-arginine dans le milieu extracellulaire et donc en l'augmentation de la production de NO par les cellules NOS-positives dont les neurones avoisinants (Yamada et al., 1997). Ainsi, les cellules gliales peuvent aussi agir comme modulateur de la production de NO en contrôlant la disponibilité du substrat. Les cellules gliales sont donc un élément clef du métabolisme nitrinergique et engendrent une diversité d'action non soupçonnée sur la modulation de l'activité neuronale.

#### **1.5.6 LE RÔLE DU NO À LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE.**

Les sections précédentes ont principalement traité de l'implication du NO dans la neurotransmission centrale. Cependant, la jonction neuromusculaire est aussi un bon modèle afin d'étudier le métabolisme nitrinergique et son implication sur la transmission synaptique. En effet, plusieurs études ont démontré la présence de la NOS à la JNM et principalement à la plaque motrice notamment dans les fibres musculaires (Nakane et al., 1993; Kobzik et al., 1994; Yang et al., 1997). L'isoforme de NOS la plus abondante est la forme neuronale  $\mu$  (Silvagno et al., 1996). Comme mentionné à la section 1.5.1.1.2.3, la nNOS possède un domaine n-terminal PDZ permettant son association avec des protéines postsynaptiques localisées à la plaque motrice dont le récepteur NMDA (Grozdanovic et Gossrau, 1998) et la syntrophine- $\alpha 1$  (Brenman et al., 1996), protéine associée au complexe

dystrophine-glycoprotéine (CDG). Ce complexe sert de lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, ce qui préviendrait les dommages au sarcoplasme pendant les cycles intenses de contractions musculaires en transférant les forces aux fibres de tissu conjonctif (Ervasti et Campbell, 1991). La NOS se retrouve également au niveau des cellules de Schwann périssynaptiques (CSP) (Descarries et al., 1998) et au niveau de la terminaison motoneuronale (Ribera et al., 1998). Ainsi, le NO est susceptible d'être produit par les trois éléments de la JNM bien qu'aucune évidence directe ne permet d'identifier à la JNM la contribution de ces différentes sources potentielles de NO à une forme de modulation de la transmission synaptique. Au niveau du SNC, la contribution du NO dans les phénomènes de plasticité synaptique est bien acceptée. Toutefois, l'étude des réseaux neuronaux complexes du SNC génèrent des questions qui demeurent irrésolues (O'Dell et al., 1991; Schuman et Madison, 1991; Shibuki et Okada, 1991; Haley et al., 1992). Notamment à savoir par quels mécanismes le NO parvient-il à affecter la libération de neurotransmetteurs? En affectant la quantité de neurotransmetteurs libérés ou en affectant la sensibilité des récepteurs pour les neurotransmetteurs?

Ces questions sont difficilement adressables dans un système aussi complexe et inaccessible que le SNC. L'étude du NO à la jonction neuromusculaire permet, par sa simplicité, de répondre à de nombreuses questions restées irrésolues par les études effectuées dans le SNC. Il a été démontré, par plusieurs groupes de recherche utilisant différentes préparations neuromusculaires, que le NO diminue la libération de l'ACh. Effectivement, ces études ont démontré, par des analyses quantiques, que l'application de NO exogène diminue la taille des potentiels de plaque motrice (PPM) en diminuant la quantité d'ACh libérée (Lindgren et Laird, 1994; Wang et al., 1995; Ribera et al., 1998; Thomas et Robitaille, 2001; Etherington et Everett, 2004) via un mécanisme dépendant du GMPc (Thomas et Robitaille, 2001). Cette dernière étude démontre que l'application de donneurs de NO agit sur la fréquence de MEPPS sans affecter leur amplitude suggérant ainsi une action présynaptique du NO (Thomas et Robitaille, 2001). Les études d'imagerie calcique effectuées à l'aide des mêmes donneurs démontrent que le NO n'affecte pas la gestion du calcium présynaptique. Au niveau des JNMs de mammifères, une étude récente démontre à

l'inverse que le NO aurait plutôt une contribution potentialisatrice ressemblant davantage au rôle du NO dans le SNC. En effet, cette étude démontre que le NO augmente la transmission suite à la stimulation de la GC et la production de GMPc. Le GMPc inhiberait la phosphodiesterase-3 permettant l'augmentation des taux d'AMPc lequel agit sur les canaux calciques de type N favorisant une augmentation de l'entrée de calcium résultant en une augmentation de la libération de neurotransmetteurs (Nickels et al., 2007). L'effet du NO ne se limite toutefois pas à la terminaison synaptique. En effet, il a été démontré que le NO module aussi les réponses calciques gliales induites par l'ATP (Descarries et al., 1998). Cette action pourrait notamment servir, selon les auteurs, de boucle de rétroaction négative à l'activité des CSPs lors de stimulation intense de la synapse.

De plus, il a été démontré que le NO participe aux phénomènes de dépression synaptique à court et à long terme. En effet, (Thomas et Robitaille, 2001) ont démontré que le NO est non seulement produit de manière tonique à la JNM mais qu'il est aussi produit lors de la dépression synaptique induite par la stimulation à haute fréquence du nerf moteur (10Hz, 80 secondes). Le NO produit sous ces conditions augmenterait de façon significative la dépression synaptique en agissant de manière indépendante du GMPc. Ainsi, il semble que le mécanisme d'action du NO à la JNM de grenouille soit dichotomique car l'effet du NO libéré de manière tonique est cGMP-dépendant alors que son effet sur la dépression synaptique est indépendant du cGMP. Le NO serait aussi impliqué dans la dépression à long terme induite par la stimulation du nerf moteur à basse fréquence (1Hz, 20 minutes)(Aonuma et al., 2000; Etherington et Everett, 2004). (Etherington et Everett, 2004) démontrent que la diminution significative de la transmission synaptique, observée sous ces conditions, serait causée par un effet présynaptique cGMP-dépendant du NO et que la persistance de la dépression serait causée par la déphosphorylation de la calcineurine permettant une production soutenue de NO. Le rôle du NO comme agent potentialisateur ou répresseur de la transmission synaptique ne fait maintenant aucun doute. Toutefois, la source du NO demeure controversée. En effet, certaines études ont rapporté une production musculaire de

NO (Etherington et Everett, 2004) alors que d'autre soutiennent plutôt l'hypothèse d'une source gliale (Thomas et Robitaille, 2001). Aucune n'est arrivée à démontrer de manière incontestable l'origine du NO impliqué dans la modulation de la transmission et la plasticité synaptique à la JNM.

### **1.5.7 MÉTHODES D'ÉTUDE DU MÉTABOLISME NITRINERGIQUE**

Les connaissances que nous avons aujourd'hui de l'implication du NO dans les phénomènes physiologiques, allant du contrôle de la lumière des vaisseaux sanguins à la modulation de la transmission synaptique en passant par la lutte aux pathogènes, dérivent, pour la plupart, d'outils pharmacologiques. Il existe de nos jours une pléiade d'agents pharmacologiques permettant d'activer ou d'inhiber la synthèse du NO et ses cibles ainsi que de localiser les cellules produisant ou étant affectées par le NO. Premièrement, la production de NO peut être court-circuitée par des chélateurs du NO perméables ou non aux membranes plasmiques ou par des molécules inhibant directement la NOS. Ces molécules peuvent être spécifiques aux différentes isoformes. Certaines molécules sont aussi utilisées afin d'inhiber les GMPc ou la PKG afin de bloquer la signalisation du NO. Des donneurs de NO ainsi que du NO encagé peuvent aussi être utilisés afin de libérer le NO sur commande. D'autre part, il existe, afin de localiser les cellules productrices, des anticorps spécifiques contre les différentes isoformes de NOS et le marquage à l'aide de la technique de la NADPH diaphorase. Cette dernière prend avantage de la capacité de la NOS de catalyser la transformation du sel de tétrazolium soluble en formazan d'une manière qui est dépendante du NADPH (Hope et al., 1991). Le formazan est une molécule insoluble qui précipite, permettant son observation en microscopie et ainsi permettre la détection des cellules contenant la NOS. Finalement, une nouvelle famille de molécules a vu le jour dans les dernières années et permet la visualisation de la production de NO en fluorescence. Ces composés sont non fluorescents avant leur liaison avec le NO. Le DAF-FM diacétate pénètre librement dans les cellules où il est déacétylé par les estérases intracellulaires afin de générer la forme DAF-FM (Nakatsubo et al., 1998). La fluorescence du DAF (FM ou non) augmente d'un

facteur de 160 lorsque lié au NO. Ainsi plusieurs outils sont disponibles pour l'étude du NO et ses rôles physiologiques.

## **1.6 PLASTICITÉ SYNAPTIQUE**

La synapse, comme décrite à la section 1.2, est une structure plastique dont les propriétés morphologiques et fonctionnelles varient selon l'environnement et l'expérience. La modification de l'efficacité de la transmission de l'information entre les neurones est un exemple typique montrant la synapse comme un élément dynamique et est en fait considérée comme le mécanisme cellulaire à la base de la mémoire et de l'apprentissage. Beaucoup d'efforts de recherche sont portés, depuis les premières descriptions de la plasticité synaptique, à découvrir précisément les mécanismes physiologiques, cellulaires et génétiques impliqués dans ces modifications. Classiquement, on regroupe les phénomènes de plasticité selon l'échelle de temps sur laquelle ils se développent. On parle ainsi de plasticité synaptique à court et à long terme. Qu'elle soit durable ou très brève, la plasticité synaptique peut s'exprimer en haussant l'efficacité de la transmission entre neurones, ce qu'on appelle la potentialisation ou en la réduisant, on parle alors de dépression synaptique. Ces différentes formes de plasticité seront décrites dans les prochaines sections avec une attention particulière portée aux mécanismes de la dépression synaptique à court terme dû à l'importance de ce phénomène de plasticité pour la JNM.

### **1.6.1 POTENTIALISATION SYNAPTIQUE À LONG TERME (PLT)**

Les formes de plasticité synaptique à long terme constituent un modèle attrayant afin d'expliquer les fonctions cérébrales complexes comme la mémoire du fait de leur persistance dans le temps (Bliss et Gardner-Medwin, 1973; Nicoll et al., 1988). C'est sur la base de cette prémisse que les neuroscientifiques ont initialement porté un intérêt considérable à l'étude de ces phénomènes et notamment à la



potentialisation à long terme (PLT). La description de cette dernière fut d'abord établie au niveau de l'hippocampe (Bliss et Gardner-Medwin, 1973), puis par la suite, à une plus vaste étendue de structures dont les aires néocorticales.

La majorité des données concernant les mécanismes et les différentes formes d'expression de la plasticité proviennent encore abondamment d'études effectuées au niveau de l'hippocampe, structure dont l'importance dans les processus de mémorisation n'est plus débattue. Il existe au sein de l'hippocampe deux formes de PLT, l'une dépendante et l'autre indépendante des récepteurs NMDA. La première forme, que l'on nomme aussi associative, a lieu au niveau des collatérales de Schaffer. À cette synapse, l'expression de la PLT est déclenchée uniquement si certaines conditions sont respectées, notamment la convergence d'activité de plusieurs neurones présynaptiques (coopérativité) et une dépolarisation coïncidente postsynaptique (associativité). Cette propriété permet la dépolarisation massive de l'élément postsynaptique et le déclenchement d'événements intracellulaires essentiels à l'induction de la PLT. En effet, la dépolarisation massive du neurone postsynaptique place le récepteur NMDA dans un état favorable à son ouverture permettant l'entrée de calcium (voir section 1.4.2.1.3). La présence de calcium dans le cytoplasme postsynaptique permet l'activation de plusieurs kinases dont la calmoduline kinase II (CaMKII) et la PKC, lesquelles agissent par la suite sur leurs substrats spécifiques permettant le maintien à long terme des conditions de potentialisation (Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989). Par exemple la CaMKII en phosphorylant les récepteurs AMPA induit une augmentation de leur sensibilité ainsi qu'une augmentation de leur expression à la surface des neurones (Barria et al., 1997). Il est cependant simpliste d'affirmer que la PLT s'explique uniquement par des mécanismes ayant exclusivement lieu dans le neurone postsynaptique. En effet, des évidences démontrent une augmentation de la libération présynaptique de glutamate pendant la PLT (Stevens et Wang, 1994; Bolshakov et Siegelbaum, 1995). Cette augmentation de la libération de glutamate serait le résultat de messagers rétrogrades produits par le neurone postsynaptique. L'oxyde nitrique serait l'un des candidats potentiels responsables de la contribution de l'élément présynaptique à la PLT (Schuman et Madison, 1991).

La seconde forme de PLT décrite dans l'hippocampe implique la voie des fibres moussues et est aussi nommée non-associative et n'implique que très peu les récepteurs NMDA. Cette forme de PLT serait plutôt la conséquence de l'augmentation des niveaux de calcium présynaptique causée par une stimulation tétanique provoquant l'activation de l'AMPC et la PKA (Nicoll et Malenka, 1995) qui affecterait la machinerie d'endocytose notamment la protéine vésiculaire rab3a (Castillo et al., 1997).

Les formes de PLT décrites ci-dessus sont ce qu'on appelle la PLT précoce laquelle persiste pour une période de une à trois heures. Le maintien sur plusieurs jours de la potentialisation est pour sa part nommée PLT tardive et les mécanismes impliqués sont communs aux formes associative et non-associative de la PLT. Les mécanismes cellulaires mis en cause dans sa persistance engagent la synthèse de nouveaux ARNm et protéines ainsi que l'activation de la voie de l'AMPC-PKA-MAPK-CREB (Bourtchuladze et al., 1994; Abel et al., 1997). Les protéines nouvellement synthétisées pourraient participer notamment à la construction de nouveaux réseaux synaptiques ou au renforcement de contacts synaptiques déjà établis.

## 1.6.2 DÉPRESSION SYNAPTIQUE À LONG TERME (DLT)

Contrairement à la PLT qui permet le renforcement des synapses, la dépression à long terme (DLT), permet pour sa part de diminuer l'efficacité des connexions entre neurones. L'existence de la DLT, mise en lumière pour la première fois au niveau du cervelet (Ito et al., 1982), résulte de modifications essentiellement postsynaptiques et ne semble pas mettre en jeu la portion présynaptique. Le mécanisme central impliqué dans le développement de la DLT consiste en une phosphorylation des récepteurs AMPA qui leur conférerait une moindre sensibilité au glutamate (Hemart et al., 1994). Cette phosphorylation serait le résultat de l'activation d'une multitude de messagers intracellulaires par modification des taux de calcium. Des conditions environnementales ou expérimentales particulières, notamment les paramètres de stimulation spécifiques à

la structure à l'étude (stimulation à de basses fréquences mais de plus longues durées), sont essentielles au déclenchement de la DLT. Des subtilités existent dans les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la dépression selon la structure anatomique à l'étude. Afin de simplifier la description de ces derniers, ils seront décrits en se basant sur le modèle de la DLT au niveau de la synapse entre les fibres grimpantes et parallèles avec les cellules de Purkinje du cervelet. Suite à la libération du glutamate, les récepteurs AMPA postsynaptiques sont activés provoquant une dépolarisation du neurone et l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (Ito, 1984). L'effet de la concomitance de ces deux événements est l'augmentation massive de la concentration de calcium au sein du cytoplasme neuronal, étape essentielle au développement de la DLT. En parallèle, l'activation des mGluR1 permet d'augmenter le calcium intracellulaire par l'intermédiaire de l'IP3 et des réserves intracellulaires de calcium (Daniel et al., 1992). Cette voie permet aussi l'activation de la PKC, kinase essentielle à la phosphorylation et l'inactivation du récepteur AMPA (Crepel et Krupa, 1988; Hemart et al., 1994). Une seconde kinase joue aussi un rôle essentiel dans le maintien de l'état phosphorylé et inactif du récepteur. En effet, la PKG, activée par l'action de l'oxyde nitrique provenant de la terminaison présynaptique sur la guanylate cyclase, inhibe l'activité des protéines phosphatases permettant le maintien du récepteur dans son état phosphorylé (Daniel et al., 1993; Hartell, 1994; Blond et al., 1997). Ce schéma simplifié ne permet toutefois pas d'expliquer le maintien dans le temps des paramètres synaptiques en changement. Il semblerait que cette propriété soit le résultat de modification de l'expression génique et de la synthèse de nouvelles protéines permettant le maintien et la stabilisation à long terme de la dépression (Linden, 1996). Finalement, l'internalisation des récepteurs AMPA suite à la phosphorylation de la protéine GRIP (glutamate receptor interacting protein) par la PKC permettrait de diminuer l'expression de surface du récepteur (Matsuda et al., 2000; Hirai, 2001). La modification à long terme de l'efficacité de la transmission synaptique, dans le cas présent de la dépression, est considérée aujourd'hui comme mécanisme cellulaire à la base de l'apprentissage et

de la mémoire. De nombreuses études restent toutefois à faire afin de démontrer la validité de ces modèles chez l'animal éveillé et chez l'humain.

### 1.6.3 POTENTIALISATION SYNAPTIQUE À COURT TERME

La potentialisation à court terme, contrairement à son homologue la PLT, se déroule à l'intérieur d'un intervalle de temps plus court. Il existe essentiellement trois formes de potentialisation de la transmission synaptique à court terme qui se distinguent justement selon l'intervalle de temps pendant lesquelles ils s'expriment.

La facilitation se façonne en une centaine de millisecondes alors que l'augmentation se déroule en quelques secondes et que la potentialisation s'étale sur plusieurs minutes. La facilitation synaptique pairée est toutefois à distinguer des autres formes de potentialisation. Elle s'exprime spécifiquement lorsque deux stimuli temporellement rapprochés (20-500 msec) sont délivrés à la synapse provoquant une augmentation de l'amplitude du deuxième potentiel synaptique. Pour leur part, la facilitation, l'augmentation et la potentialisation sont induites par des trains de stimulation et se développent avec des délais respectivement plus grands. Une potentialisation est parfois observée après l'arrêt du train de stimulation téτανique et porte le nom particulier de potentialisation post-tétanique (PPT). Toutes ces formes de potentialisation à court terme seraient d'origine présynaptique comme démontré par des analyses quantiques. Elles impliquent donc une augmentation du nombre de quanta de neurotransmetteurs libéré plutôt qu'une augmentation de la taille des quanta ou de l'efficacité postsynaptique.

L'hypothèse du calcium résiduel, acceptée bien qu'imparfaite et qui permet d'expliquer la facilitation, soutient qu'une partie du calcium accumulé dans la terminaison présynaptique, suite à la première dépolarisation, s'additionne avec le calcium d'une deuxième dépolarisation. La concentration plus élevée de calcium dans la terminaison induit une libération de neurotransmetteurs plus importante causant ainsi une augmentation du potentiel postsynaptique. La facilitation pairée, serait caractérisée par une accumulation brève de calcium comparativement à

l'accumulation persistante de calcium observée lors de la facilitation et la potentialisation résultant de la stimulation prolongée (Kamiya et Zucker, 1994).

Les mécanismes moléculaires engagés dans la production de la potentialisation incluent notamment la phosphorylation par la CaMKI, II ainsi que par la PKA de protéines impliquées dans l'exocytose (Lin et al., 1990; Hosaka et al., 1999).

#### **1.6.4 DÉPRESSION SYNAPTIQUE À COURT TERME**

La dépression synaptique à court terme est un mécanisme important pour l'intégration de l'information au sein des réseaux neuronaux (Abbott et al., 1997; Nadim et al., 1999). La dépression est, comme la potentialisation à court terme, induite par l'activité répétitive de la terminaison présynaptique (Eccles et O'Connor W, 1941; Liley et North, 1953; Del Castillo et Katz, 1954). Alors, quelles sont les propriétés de la synapse responsables de l'expression de l'une ou l'autre de ces formes de plasticité? La polarité de la plasticité dépend de l'état initial de la synapse. Comme la plasticité synaptique est essentiellement une modification de la probabilité de libération de neurotransmetteurs, la tendance de la synapse à se diriger vers la dépression ou la potentialisation dépend de la probabilité de libération intrinsèque de cette synapse (Bolshakov et Siegelbaum, 1995; Dobrunz et Stevens, 1997). Les synapses dont la probabilité de libération est très haute auront tendance à déprimer. La probabilité théorique de libération maximale étant de un, les synapses dont la probabilité de libération est presque plafonnée ne peuvent davantage potentialiser. D'autre part, les synapses dont la probabilité est faible auront tendance à potentialiser. La propension des synapses vers une forme de plasticité serait aussi corrélée avec leur morphologie. En effet, les zones actives démontrant de la facilitation sont souvent plus petites et la densité d'empaquetage des vésicules synaptiques est généralement moindre (Bower et Haberly, 1986; Schikorski et Stevens, 1997). L'une des caractéristiques importantes de la dépression synaptique à court terme est la dépendance à l'usage. Effectivement, cette propriété fait varier l'ampleur de la dépression selon les niveaux de la transmission basale. Une synapse

dont la libération de neurotransmetteurs est élevée déprimera davantage qu'une synapse dont la transmission basale est faible. Les synapses démontrant une dépression robuste, notamment la jonction neuromusculaire, dont il a été question à la section 1.3, ont permis d'identifier les mécanismes impliqués dans la dépression synaptique. Ces derniers ont été catégorisés ici en quatre groupes soit les mécanismes présynaptiques et postsynaptiques ainsi que l'implication des récepteurs métabotropes présynaptiques et des cellules gliales.

#### **1.6.4.1 MÉCANISMES PRÉSYNAPTQUES**

Plusieurs mécanismes présynaptiques apportent une contribution à la dépression. Premièrement, tous les changements affectant la concentration de calcium dans la terminaison à proximité des vésicules synaptiques sont susceptibles d'affecter la dépression. La forme du potentiel d'action par exemple, peut modifier la quantité de neurotransmetteurs libérée. En règle générale, un rétrécissement du potentiel d'action, limitant l'entrée de calcium, facilite la dépression. De plus, l'inactivation des courants calciques présynaptiques peut aussi être impliquée dans la dépression (Borst et al., 1995; Forsythe et al., 1998). La déplétion du calcium extracellulaire pourrait finalement contribuer à expliquer la dépression (Rusakov et Fine, 2003). Les mécanismes mentionnés précédemment n'apportent toutefois qu'une faible contribution à l'explication des mécanismes sous-tendant la dépression synaptique à court terme.

Le modèle privilégié serait plutôt une déplétion des vésicules prêtes à être libérées par la terminaison présynaptique. L'anatomie de la synapse, dévoilée en microscopie électronique, démontre qu'une terminaison synaptique peut contenir jusqu'à une centaine de vésicules synaptiques près des sites de libération dont seulement une faible proportion est en contact direct avec la membrane terminale. Ces vésicules amarrées, ou vésicules de la réserve prête à être libérée RRP (readily releasable pool), sont prêtes à fusionner suite à l'arrivée du potentiel d'action. Les vésicules localisées à distance de la membrane et ne pouvant pas répondre de manière spontanée à l'arrivée du potentiel d'action sont pour leur part nommées

simplement vésicules de réserve. Lors d'une stimulation répétée, la déplétion des vésicules de la RRP diminue le nombre de vésicules libérées par potentiel d'action expliquant ainsi la subséquente dépression synaptique. Sous ces conditions de stimulation, la RRP est continuellement renouvelée avec des vésicules provenant de la réserve. Ainsi, selon ce modèle, l'ampleur de la dépression dépendrait du nombre de vésicules présentes dans le RRP et dans la réserve de vésicules ainsi que du taux d'échange entre les deux réservoirs. En somme, la dépression serait le résultat d'une diminution de la probabilité de libération de neurotransmetteurs ( $p$ ) et/ou du nombre de quanta ( $n$ ) libérés, observation corroborée par les analyses statistiques. Toutefois, ce modèle est basé sur des prémisses plus ou moins exactes. Notamment, le modèle considère que chacun des sites de libération possède la même probabilité de libération. Par ailleurs, cette description est remise en question par des études démontrant l'hétérogénéité des probabilités de libération pour différentes zones de libération et ce au sein d'une même synapse (Murthy et al., 1997).

Finalement, certains facteurs, non considérés dans le modèle de base, peuvent jouer sur l'expression de la dépression. Par exemple, le nombre limité de zones actives et de sites d'amarrage pour les vésicules ainsi que la limitation quant au recyclage des vésicules de réserve par l'endocytose, font partie des facteurs exclus du modèle de déplétion bien que susceptibles d'influencer l'expression de la dépression (Zucker et Regehr, 2002).

Un dernier facteur s'avérant incompatible avec le modèle de déplétion concerne l'étude de la libération spontanée. En effet, lors de stimulation répétée aucune modification de la fréquence des événements miniatures n'est observée, comme le laisserait présumer le modèle (Eliot et al., 1994). Cette dernière constatation pourrait cependant s'expliquer en supposant que les vésicules de libération spontanées proviennent d'une réserve particulière possédant des propriétés distinctes. Ainsi, bien que le modèle de déplétion des vésicules synaptiques demeure le modèle prépondérant afin d'expliquer la dépression synaptique, il demeure des incertitudes limitant sa validité.

#### 1.6.4.2 MÉCANISMES POSTSYNAPTiques

Bien que l'importance des mécanismes présynaptiques à la dépression soit considérable, certains mécanismes postsynaptiques peuvent aussi entrer en ligne de compte et mener à la dépression. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment la désensibilisation des récepteurs postsynaptiques. Lors de l'exposition excessive ou prolongée des récepteurs ionotropes à son agoniste, une partie de ceux-ci s'ouvriront afin de produire l'effet escompté. Toutefois, certains récepteurs se placeront dans un état de non-réponse causant ainsi une diminution de l'amplitude des potentiels postsynaptiques enregistrés (Zucker et Regehr, 2002). Cependant, l'étendue des interactions entre les mécanismes pré et postsynaptiques sur la dépression rend difficile leur étude. Par exemple, de hauts niveaux de stimulation causent une déplétion des vésicules mais promeut une désensibilisation des récepteurs postsynaptiques. Somme toute, quelques lignes directrices ressortent. La désensibilisation des récepteurs par une exposition massive à son ligand rend le récepteur dans un état non disponible pour une durée allant de quelques secondes à quelques minutes. Aux synapses glutamatergiques centrales, la stimulation à très haute fréquence (200Hz) provoque une désensibilisation des récepteurs AMPA (Zhang et Trussell, 1994), bien que la contribution de ce phénomène à la dépression varie selon les synapses et la maturité de ces dernières ainsi que de l'efficacité du système de transporteur au glutamate. Au calice de Held, la contribution de la désensibilisation à la dépression est imposante et l'ajout de bloqueurs des transporteurs au glutamate augmente l'expression de la dépression (Trussell et al., 1993; Otis et al., 1996; Turecek et Trussell, 2000). Le degré de contribution de la désensibilisation dépend de plusieurs facteurs notamment de la morphologie de la synapse, de la probabilité de libération et la vitesse de transit du glutamate dans la fente synaptique. La distance plus faible entre les zones actives ainsi que le recouvrement plus lâche des synapses par les cellules gliales permet la diffusion du glutamate et la désensibilisation des récepteurs localisés sur les zones actives adjacentes. En effet, un recouvrement glial trop dense ou une plus grande distance séparant les zones actives limitent la dispersion du glutamate aux zones actives.



voisines. D'autres zones actives sont, pour leur part, si bien isolées les unes des autres que la désensibilisation est très localisée (Xu-Friedman et al., 2001). La saturation des récepteurs postsynaptiques, suite à la libération massive de glutamate par des dépolarisations de plus de 10 millisecondes (Wu et Borst, 1999), a été observée bien que cette contribution demeure contestée.

Finalement, le neurone postsynaptique peut aussi moduler la libération de neurotransmetteurs par la terminaison via un contrôle rétrograde. Les dendrites sont capables de libérer des agents neuromodulateurs, lesquels agissent sur les récepteurs présynaptiques, notamment le glutamate, le GABA et les endocannabinoïdes (Zilberter et al., 1999; Zilberter, 2000; Wilson et Nicoll, 2001).

#### **1.6.4.3 INHIBITION PAR LES RÉCEPTEURS MÉTABOTROPES PRÉSYPNAPTQUES**

De nombreuses terminaisons présynaptiques au sein du SNC possèdent des récepteurs métabotropes de haute affinité pour le GABA, le glutamate ou l'adénosine et dont l'activation peut influencer la transmission synaptique (Zucker et Regehr, 2002). Les récepteurs présynaptiques peuvent être activés par le même neurotransmetteur utilisé par la terminaison sur laquelle ils se trouvent (autorécepteurs) et l'effet sera caractérisé d'homosynaptique. Les récepteurs peuvent aussi être d'un type différent et répondre à un neurotransmetteur provenant d'une autre terminaison et l'effet est alors hétérosynaptique. Ainsi, l'activation de ces récepteurs peut mener à une diminution de la relâche de neurotransmetteurs. Dans le cas de l'inhibition homosynaptique, la stimulation à haute fréquence, provoque une accumulation suffisante de neurotransmetteurs permettant d'activer les récepteurs présynaptiques causant une boucle de réverbération négative sur la libération. L'inhibition hétérosynaptique pour sa part, est causée par l'accumulation d'un neurotransmetteur de type différent provenant d'une synapse voisine. Les interneurones gabaergiques peuvent par exemple moduler l'activité de synapses glutamatergiques en activant des récepteurs présynaptiques de type GABA<sub>B</sub>. L'inhibition présynaptique peut moduler la libération de neurotransmetteurs principalement par trois mécanismes principaux. Premièrement, l'activation des

récepteurs présynaptiques couplés aux protéines G peut mener à l'inactivation des canaux calciques présynaptiques. Notamment, il a été démontré que les courants calciques présynaptiques de type N et P/Q peuvent être inactivés sous l'action des récepteurs métabotropes de type GABA, mGluRs, adrénergiques et à l'adénosine (Barnes-Davies et Forsythe, 1995; Dolphin, 1995; Wu et Saggau, 1997; Isaacson, 1998; Leao et Von Gersdorff, 2002). La difficulté d'enregistrement dans les terminaisons présynaptiques, rend cependant l'étude de la localisation des récepteurs et des canaux difficile. Toutefois, des expériences menées au niveau du calice de Held démontrent la relation entre l'activation des mGluRs et l'inactivation des conductances calciques présynaptiques (Takahashi et al., 1996). Une seconde façon, dont les récepteurs présynaptiques modifient à la baisse la transmission, est via l'activation de conductances potassiques et chloriques provoquant un "shunt" du potentiel d'action. Ceci a comme effet de réduire l'amplitude du potentiel d'action et conséquemment de réduire l'entrée de calcium dans la terminaison (Segev, 1990; Gage, 1992). Finalement, l'activation des récepteurs présynaptiques pourrait moduler la machinerie d'exocytose (Silinsky, 1984; Linial et al., 1997).

#### **1.6.4.4 AUTRES MÉCANISMES DE LA DÉPRESSION**

La dépression peut aussi être causée par d'autres facteurs dont l'influence varie en amplitude. Notamment, la quantité de neurotransmetteurs par vésicule peut varier avec l'activité. En effet, à la jonction neuromusculaire, il a été observé qu'une stimulation prolongée provoque une diminution de la taille des quanta (Van der Kloot et Molgo, 1994). La déplétion du calcium extracellulaire dans la fente synaptique peut aussi causer une diminution de l'activité synaptique. En considérant les dimensions limitées de la fente synaptique ainsi que les quantités massives de calcium impliquées dans les mécanismes de libération, l'on devrait s'attendre, du moins théoriquement, à un épuisement rapide du calcium extracellulaire limitant ainsi la libération subséquente de neurotransmetteurs. Cependant, il semble que ce phénomène ait très peu d'influence sur la dépression synaptique, à tout le moins au calice de Held (Borst et Sakmann, 1999). Finalement, comme mentionné

précédemment, la régulation de l'endocytose peut jouer un rôle variable dans la dépression. En effet, la fréquence de stimulation pourrait influencer la vitesse d'emballage des vésicules ainsi que leur recyclage à la jonction neuromusculaire (Delgado et al., 2000).

#### **1.6.4.5 IMPLICATION DES CELLULES GLIALES À LA DÉPRESSION SYNAPTIQUE.**

L'implication des cellules gliales dans la modulation de la libération de neurotransmetteurs ne fait, aujourd'hui, plus aucun doute. Leur association intime avec la synapse, ainsi que la présence d'une variété de récepteurs sur leurs membranes, leur confèrent un rôle privilégié à la synapse (Verkhratsky et Kettenmann, 1996). Les cellules gliales ont la capacité d'ajuster la concentration extracellulaire de neurotransmetteurs par l'intermédiaire de systèmes de transporteurs (Bergles et al., 1999; Danbolt, 2001). Elles limitent ainsi la quantité de glutamate disponible pour l'activation des récepteurs postsynaptiques. De plus, les cellules gliales répondent à l'activité nerveuse par des élévations de leur niveaux de calcium intracellulaire, ce qui engendre des conséquences physiologiques nombreuses sur la synapse. Notamment, il a été démontré que l'activation des cellules gliales induit la libération de substances neuromodulatrices (Heumann et al., 1981; Parpura et al., 1994; Bezzi et al., 1998; Bergles et al., 1999; Danbolt, 2001; Huang et Bergles, 2004). Ces transmetteurs chimiques, nommés gliotransmetteurs, ont plusieurs effets sur les neurones, dont celui de moduler la transmission synaptique. En effet, les travaux pionniers d'Araque et collaborateurs (1998) ont démontré que, suite à leur activation, les astrocytes libèrent du glutamate causant une diminution de la transmission synaptique évoquée par les potentiels d'actions présynaptiques. Depuis, nombreuses études, notamment à la jonction neuromusculaire, sont venues appuyer cette observation, si bien que l'implication des cellules gliales dans la plasticité synaptique est devenue acceptée.

### 1.6.5 PLASTICITÉ À LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

La jonction neuromusculaire est un modèle d'étude avantageux afin d'investiguer les mécanismes de plasticité synaptique. En effet, seules les terminaisons motoneuronales considérées purement cholinergiques innervent les fibres musculaires (voir section 1.3.1) simplifiant largement l'étude des mécanismes impliqués dans l'expression de la plasticité. L'efficacité de la libération de neurotransmetteurs par la JNM peut être influencée par de nombreux facteurs pré et postsynaptiques agissant à plus ou moins long terme. Certains de ces facteurs impliquent des changements structuraux, lesquels sont relativement stables, tandis que des changements plus dynamiques opérant sur la JNM s'expriment sur une échelle de temps plus courte. Les variations dans la libération de neurotransmetteurs à court terme sont notamment influencées par les patrons de stimulation. Au cours d'une stimulation à haute fréquence, les variations de la libération de neurotransmetteurs arrivent en deux temps. En effet, lors de stimulations intenses de la terminaison motoneuronale, la dépression synaptique prédomine et surplombe la potentialisation. Dans certaines conditions, l'arrêt de la stimulation intense induit une période de potentialisation post-tétanique. Pour sa part, la potentialisation est observée dans des conditions propices à son expression, c'est-à-dire lorsque la probabilité de relâche est diminuée artificiellement par une modification des taux de calcium. Parfois, une brève période de potentialisation est induite par les premiers 'pulses' d'un train à haute fréquence avant de laisser place à la dépression. De plus, des expériences menées à la JNM d'amphibien ont démontré la contribution du NO et l'implication des cellules gliales dans la modulation de la plasticité synaptique (Robitaille, 1998; Thomas et Robitaille, 2001). Des changements à long-terme sont aussi observés à la JNM et impliquent des modifications structurales, de croissance neuronale et de formation de nouveaux contacts synaptiques (Personius et Balice-Gordon, 2002).

## 1.7 COTRANSMISSION

Le postulat proposé par Burnstock et collaborateurs en 1976 (Burnstock, 1976), proposant que les terminaisons nerveuses sont capables de synthétiser, emmagasiner et libérer plus d'un neurotransmetteur est venu contredire la définition classique du principe de Dale. Aujourd'hui les évidences s'accumulent et confirment qu'en effet plus d'un neurotransmetteur peut être libéré à la synapse et agir sur les neurones postsynaptiques. La colocalisation de substances neuromodulatrices dans la terminaison présynaptique n'établit cependant pas obligatoirement que les deux substances soient considérées comme cotransmetteurs. Prenons notamment le cas du neuropeptide Y qui agit comme neuromodulateur à la synapse mais cela sans affecter directement l'élément postsynaptique. Son effet est plutôt le résultat d'une modulation indirecte de la libération des véritables cotransmetteurs soit l'ATP et la noradrénaline (Ellis et Burnstock, 1990; Bradley et al., 2003). Les critères nécessaires afin d'établir des molécules colocalisées dans une terminaison comme cotransmetteurs sont :

- La molécule doit être synthétisée et emmagasinée dans le neurone
- Elle doit être libérée suite à la stimulation neuronale
- Des récepteurs doivent être localisés sur l'élément postsynaptique et leur activation doit mener à des modifications de l'activité postjonctionnelle
- Un système de transporteur doit être présent à la synapse

Il est maintenant bien établi que la majorité, sinon tous les neurones, libèrent de petits neurotransmetteurs (notamment, ACh, glutamate et GABA) en plus des neuropeptides (notamment, cholecystokinine, calcitonin gene-related-peptide, enkephalines, neurotensine et substance P)(Hokfelt, 1991). De plus, la cotransmission impliquant deux transmetteurs classiques est maintenant acceptée comme un phénomène très répandu (Trudeau, 2004). En considérant la complexité de la transmission et de l'intégration des signaux nerveux, la propriété des synapses

de libérer plus d'un neurotransmetteur offre davantage de possibilités de modulation et de réglages fins de la transmission de l'information. La nature différente des cotransmetteurs permet des propriétés de libération particulières. L'émission d'un potentiel d'action permet la libération des neurotransmetteurs à petites molécules alors qu'un train de stimulation plus long est requis afin de permettre la libération des neurotransmetteurs peptidiques. C'est le cas notamment de libération d'ACh et d'ATP par les motoneurones (Bradley et al., 2003). Les cotransmetteurs peuvent aussi agir sur différentes cellules ciblées par la terminaison présynaptique (Burnstock, 2004) ou agir directement sur la terminaison présynaptique pour moduler sa libération ou celle de son cotransmetteur (Jo et Role, 2002). Des évidences récentes démontrent aussi que les deux cotransmetteurs peuvent agir en synergie et de manière coopérative. C'est le cas notamment de l'ATP qui facilite l'action de l'ACh sur ses récepteurs nicotiniques (Burnstock, 1990) bien que les mécanismes demeurent à l'heure actuelle pour la plus part inconnus. Les cotransmetteurs peuvent aussi agir de manière négative ou l'un réduit l'effet de l'autre. Ainsi la réponse observée ne correspond pas à la valeur prédite par l'addition des effets séparés (Khakh et al., 2000). Ces derniers exemples démontrent les possibilités de modulation qu'offre la cotransmission.

### 1.7.1 COTRANSMISSION À LA JNM

La jonction neuromusculaire de vertébré, bien que considérée pendant de nombreuses années, comme une synapse purement cholinergique, libère aussi de l'ATP. En effet, plusieurs évidences démontrent désormais la libération dépendante de l'activité de l'ATP en parallèle avec l'ACh et ce à plusieurs type de jonctions neuromusculaires (Dowdall et al., 1974; Smith, 1991). Les récepteurs purinergiques sont retrouvés sur les trois éléments de la synapse. Les récepteurs de type P1 se retrouvent sur la terminaison présynaptique (Baxter et al., 2005) et les CSPs (Robitaille, 1995) tandis que les récepteurs à l'ATP de type P2 se retrouvent sur les trois compartiments (Rochon et al., 2001; Collet et al., 2002; Grishin et al., 2005). La signalisation purinergique à la JNM est impliquée dans le développement, la

myélinisation et les interactions synapse-glie (Todd et Robitaille, 2006). La modulation purinergique est bidirectionnelle et peut donc potentialiser ou déprimer la transmission neuromusculaire (Giniatullin et Sokolova, 1998; Reis-Santos et al., 2002).

Des démonstrations récentes proposent la présence d'un second neurotransmetteur à JNM. En effet, plusieurs groupes de recherche ont mis en évidence la présence d'une machinerie glutamatergique aux jonctions neuromusculaires d'amphibiens et de mammifères. De plus, au niveau central, des données supportent une colibération d'ACh avec le glutamate et ce notamment au niveau du tronc cérébral (Sotty et al., 2003). Aucune preuve directe de la libération et la fonctionnalité d'une neurotransmission glutamatergique à la JNM n'a cependant été démontrée bien que les données semblent pointer dans cette direction.

## 1.8 BUT DE LA THÈSE

Le but de cette thèse de doctorat porte sur l'implication du glutamate et de l'oxyde nitrique ainsi que leur coopération sur les mécanismes de dépression synaptique à court terme. Chacune des sections précédentes a abordé les principales thématiques importantes à l'élaboration de cette thèse avec une attention particulière apportée à chaque fin de section sur les particularités de la JNM. En effet, comme décrit dans ces sections, la JNM possède des propriétés, anatomiques, synaptiques et physiologiques particulières qui en font un modèle d'étude approprié pour répondre aux objectifs adressés dans cette thèse.

### 1.8.1 OBJECTIFS

- 1) Établir la contribution du glutamate dans la transmission et la plasticité synaptique et décrire les mécanismes impliqués dans cette modulation
- 2) Déterminer la contribution de l'oxyde nitrique dans la modulation glutamatergique de la transmission et la plasticité synaptique.
- 3) Décrire les mécanismes postsynaptiques dépendants du glutamate permettant la production de l'oxyde nitrique et leurs effets sur la plasticité synaptique.

Cette thèse de doctorat sera divisée en deux chapitres soit :

**Deuxième chapitre :** Modulation glutamatergique dépendante de l'oxyde nitrique à la jonction neuromusculaire. Basé sur l'article : Pinard A, Lévesque S, Vallée J. and Robitaille R. Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. European Journal of Neuroscience (2003) 18(12) : 3241-3250.



**Troisième chapitre :** Modulation glutamatergique nitrinergique dépendante à la jonction neuromusculaire. Basé sur l'article : Audrée Pinard and Richard Robitaille. Nitric oxide dependence of glutamate-mediated modulation at a vertebrate neuromuscular junction. Soumis à European Journal of Neuroscience. Numéro de référence EJM-2007-06-12526.

## **2 ARTICLES DE RECHERCHE**

### **2.1 PREMIER ARTICLE**

**Modulation glutamatergique de la plasticité  
synaptique à la jonction neuromusculaire  
de grenouille**

### 2.1.1 INTRODUCTION DU DEUXIÈME CHAPITRE

La jonction neuromusculaire est une synapse dont l'anatomie représente une forme simplifiée des connexions que l'on retrouve au sein des réseaux hyper complexes du système nerveux central. De plus, il est classiquement considéré que la JNM est une synapse purement cholinergique où le blocage des nAChR abolit totalement les dépolarisations postsynaptiques. C'est probablement grâce à cette simplicité anatomique que les travaux pionniers de Katz et collaborateur dans les années 1950 ont permis de caractériser les bases de la théorie quantique de la libération de neurotransmetteurs. La vision classique et simpliste de la neurotransmission musculaire est toutefois remise en question par les travaux de plusieurs groupes de recherche. En effet, au cours des dernières années, le concept de synapse neuromusculaire purement cholinergique a été remis en question par plusieurs groupes de recherche. De plus, il est maintenant bien accepté que les neurotransmetteurs peuvent être colibérés avec des neuromodulateurs et des neuropeptides (Matteoli et al., 1988; Matteoli et al., 1990) et à certaines synapses centrales le glutamate est colibéré avec l'ACh (Sotty et al., 2003).

Les études menées au cours des dernières années démontrent la présence, à la JNM, d'éléments structuraux retrouvés aux synapses glutamatergiques dont la présence de récepteurs de type ionotropes au glutamate (Berger et al., 1995; Grozdanovic et Gossrau, 1998; Todd et al., 2004). L'immunoréactivité pour le glutamate a aussi été démontrée dans les cellules de Schwann pérисynaptiques ainsi que dans les terminaisons présynaptiques, probablement dans les vésicules (Waerhaug et Ottersen, 1993). Des expériences plus récentes démontrent également la présence de transporteurs vésiculaires au glutamate à la JNM (Boulland et al., 2004). De plus, la présence des transporteurs plasmiques pour le glutamate de type GLT-1 a aussi été récemment démontrée (Rinholm et al., 2007a). Les éléments structuraux essentiels à la neurotransmission glutamatergique semblent tous présents à la JNM, cependant aucune étude ne démontre clairement la libération de glutamate dans des préparations de JNM de vertébrés adultes. Seules certaines études menées

sur des préparations de synaptosomes, issus du cortex cérébral et de l'organe électrique de la torpille, démontrent une co-libération de glutamate avec l'ACh (Docherty et al., 1987; Vyas et Bradford, 1987).

La présence des éléments structuraux comme les récepteurs et les transporteurs permet la prémisse facile que le glutamate doit être libéré à la JNM et doit agir sur la transmission neuromusculaire. Cependant, les preuves de cette prémisse manquent dans la littérature. En effet, bien que plusieurs études récentes se sont penchées sur cette question aucune n'a réussi à démontrer clairement le rôle du glutamate à la JNM adulte. Certaines études démontrent toutefois une contribution du glutamate sur l'activité spontanée aux JNM immatures et au niveau de co-cultures neurones-muscles d'embryons de Xénopes (Fu et al., 1995; Liou et al., 1996). Plus récemment, des évidences menées chez les vertébrés adultes démontrent la contribution du glutamate, provenant de la terminaison motoneuronale, sur les cellules de Renshaw. La contribution du glutamate à la JNM n'a cependant pu être démontrée (Mentis et al., 2005; Nishimaru et al., 2005).

La présence d'éléments structuraux glutamatergiques (transporteurs et récepteurs) suggère une probable co-transmission de l'ACh et du glutamate à la JNM. Cependant, l'étude de Waerhaug et collaborateurs démontre principalement la présence de glutamate dans les cellules de Schwann périssynaptiques (Waerhaug and Ottersen, 1993). Le concept de la synapse tripartite, élaborée à la fin des années 1990, implique une contribution active des cellules gliales dans l'intégration de la transmission synaptique. Plusieurs études se sont intéressées au rôle des cellules gliales dans la transmission synaptique et ont démontré que l'activation des cellules gliales mène à la libération du gliotransmetteur glutamate qui transite par la suite à la synapse afin d'en affecter ses propriétés. Cette dernière observation a aussi été étendue à la JNM où la contribution des CSPs à la modulation de la neurotransmission musculaire (Robitaille, 1998) a été démontrée.

Finalement, une des caractéristiques propres de la JNM est sa propension à la dépression synaptique lorsqu'elle est stimulée à de hautes fréquences. La dépression synaptique à court terme a été largement étudiée et plusieurs des données connues à l'heure actuelle sur les mécanismes impliqués dans sa genèse proviennent d'études menées à la JNM (voir section 1.6.4). Non seulement la dépression, *per se*, fait l'objet de nombreuses recherches, mais des études sur les phénomènes impliqués dans sa modulation ont aussi vues le jour. Notamment, il a été démontré que les cellules gliales modulent la dépression synaptique à la JNM (Robitaille, 1998). De plus, au niveau central des études démontrent plus spécifiquement une contribution du glutamate d'origine astrocytaire sur la plasticité synaptique à court terme (Perea et Araque, 2007).

De la revue de littérature, résumée dans cette section d'introduction du premier chapitre, découle les questions importantes suivantes : Le glutamate est-il libéré à la JNM? Quelle est la contribution du glutamate dans la transmission et la dépression synaptique? Est-ce que les CSPs participent à cette modulation par le glutamate? Quels sont les types de récepteurs impliqués dans l'effet du glutamate? Et finalement par quels mécanismes le glutamate parvient-il à exécuter ses fonctions? En résumé, le premier objectif de cette thèse est d'établir l'effet du glutamate sur la transmission et la plasticité synaptique et décrire les mécanismes impliqués dans cette modulation.

Ces questions sont à la base d'un article publié dans European Journal of Neuroscience dont le texte intégral se retrouve dans la prochaine section de cette thèse et dont la référence complète est :

- Pinard A, Lévesque S, Vallée J. and Robitaille R. Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. European Journal of Neuroscience (2003) 18(12) : 3241-3250.

Lien :<http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1460-9568.2003.03028.x>


- La contribution de l'étudiante à ce travail : Audrée Pinard a effectué les expériences, leurs analyses, l'interprétation des données obtenues et la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Richard Robitaille.
- La contribution de Sébastien Lévesque à ce travail : Sébastien a effectué une partie des expériences qui ont mené à la rédaction du manuscrit.
- La contribution de Joanne Vallée à ce travail : Joanne Vallée a effectué les expériences d'immunohistochimie.

## 2.1.2 ARTICLE DU DEUXIÈME CHAPITRE

### Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse

Audrée Pinard, Sébastien Lévesque, Joanne Vallée and Richard Robitaille  
Centre de Recherche en Sciences Neurologiques  
and  
Département de physiologie  
Université de Montréal  
Montréal, Canada  
H3C 3J7

† These two authors contributed equally

Address correspondence to: Richard Robitaille  
Département de physiologie  
Université de Montréal  
P.O. Box 6128, "Station centre-Ville"  
Montréal, Canada  
H3C 3J7  
Tel # : (514) 343-6111 ext 1946  
Fax # : (514) 343-2111  
E-mail : 

Running title: Glutamatergic modulation of a cholinergic NMJ

Number of pages: 36

Number of words in: Whole Manuscript, 8,462; Abstract, 199; Introduction, 364

Number of Figures: 7

Number of tables: 0

Number of equations: 0

### 2.1.2.1 SUMMARY

The presence and the functionality of glutamate regulation was studied at the frog neuromuscular junction (NMJ) which is a singly innervated cholinergic synapse. Brief bath application of glutamate reduced transmitter release through mGluR receptors without affecting nerve-evoked presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  entry and handling. (1S,3R)-aminocyclopentanedicarboxylic acid (ACPD), an agonist of these receptors, mimicked the effects of glutamate. (S)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG), an mGluR antagonist, had no effect on transmitter release evoked at low frequency (0.2 Hz). However, MCPG significantly reduced synaptic depression (10 Hz, 80s) by 20%, suggesting that the modulation by endogenous glutamate is mediated through mGluRs. Immunohistochemical labeling revealed the presence of mGluRs at the end plate area, primarily on muscle fibers. Functional glutamate uptake machinery was also found at the NMJ since blockade of glutamate transport by the inhibitor DL-*threo*- $\beta$ -benzyloxyaspartate (DL-TBOA) increased high frequency-induced depression, suggesting that the transporter system is used to eliminate glutamate from the extracellular space. Moreover, immunohistochemical labeling revealed that GLAST transporters are predominantly present on PSCs. However, local application of glutamate on PSCs unreliably evoked small  $\text{Ca}^{2+}$  responses, indicating a low sensitivity of these cells to glutamate. Hence, functional glutamatergic interactions at a purely cholinergic synapse shape synaptic efficacy and short-term plasticity in a frequency-dependent fashion.

**Key words:** glutamate; amphibian neuromuscular junction; metabotropic receptors; synaptic depression; perisynaptic Schwann cells; transmitter release; calcium entry, glutamate transporter.



### 2.1.2.2 INTRODUCTION

Glutamate and acetylcholine (ACh) are the most prominent excitatory neurotransmitters in vertebrate CNS and PNS, respectively. It is now well established that neurotransmitters are co-released with neuromodulators and neuropeptides at the same synapses (Matteoli et al. 1988, 1990). Although the vertebrate neuromuscular junction (NMJ) is purported to be a unique cholinergic synapse where ACh is the main neurotransmitter activating postsynaptic nicotinic ACh receptors (Fatt and Katz, 1952), there is evidence that glutamate may co-exist with ACh at this synapse. For instance, the presence of glutamatergic receptors has been reported at the rat NMJ (Berger et al., 1995; Grozdanovic and Gossrau, 1998) and glutamate-like immunoreactivity was found in presynaptic nerve terminals, possibly in synaptic vesicles, but also and mainly, in perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ (Waerhaug and Ottersen, 1993). Complementary to this, biochemical evidence also indicates that glutamate may be released from cholinergic synaptosomes from cerebral cortex (Docherty et al., 1987) and from Torpedo electric organ (Vyas and Bradford, 1987). In light of these data, it is interesting that exogenous glutamate can modulate cholinergic synapses, as suggested by the increase of spontaneous activity at immature NMJs (Liou et al., 1996) or in neuron/muscle co-cultures from 1-day-old *Xenopus* embryos (Fu et al., 1995). Based on these observations, it was proposed that glutamate may act as a neurotransmitter at cholinergic neuromuscular synapses (Waerhaug and Ottersen, 1993; Grozdanovic and Gossrau, 1997; Berger et al. 1995).

However, there is no direct evidence indicating that endogenous glutamate can regulate synaptic efficacy at a cholinergic NMJ. In addition, it is unclear whether glutamate acts as a neurotransmitter mediating direct postsynaptic action, as suggested by the results of the biochemical studies (Vyas and Bradford, 1987; Docherty et al., 1987), or if it acts as a neuromodulator that regulates the release of endogenous neurotransmitter.

We used the classic and best characterized singly innervated cholinergic synapse, the amphibian NMJ, to evaluate the role of glutamate at a cholinergic

synapse. We report that endogenous glutamate does not act as a neurotransmitter at the amphibian NMJ, but rather that it reduces the probability of ACh release via indirect action of postsynaptic metabotropic receptors in a frequency-dependent fashion. Moreover, functional re-uptake mechanisms shape the glutamate-mediated modulation of transmitter release and short-term synaptic depression.

### 2.1.2.3 MATERIAL AND METHODS

#### *Preparation:*

Cutaneous pectoris muscles and their innervation were dissected from *Rana pipiens* frogs (Anilab, Québec, Québec; Wards, St-Catherines, Ontario and Connecticut Valley Biological Supply, Southampton, Massachusetts) and pinned into a recording chamber containing normal Ringer solution (in mM): 120 NaCl, 2 KCl, 1 NaHCO<sub>3</sub>, 15 HEPES, 1.8 CaCl<sub>2</sub>. The pH was adjusted to 7.2 using NaOH 5N.

#### *Electrophysiological recordings of synaptic transmission:*

For intracellular recordings, the motor nerve was stimulated using a suction electrode that delivered supra-threshold stimulus at a frequency of 0.2Hz. EPPs were recorded with a sharp glass microelectrode (10-20M $\Omega$ , filled with KCl, 1M) and the signal was amplified 200 to 1000 times with a Warner Scientific amplifier and filtered at 2KHz. The EPPs and the miniature EPPs (MEPPs) were recorded with Tomahacq software (T.A. Goldthorpe, University of Toronto, Canada) or with Strathclyde electrophysiology software (J. Dempster, University of Strathclyde, Scotland). For all experiments, membrane potential (Em) of the muscle fibers was between -80mV and -95mV. Experiments where Em depolarised by more than 15mV were excluded from the study. In all experiments, constant perfusion was performed with Ringer solution at room temperature (21-23°C). Following 15-30 min of control, drugs were added to the perfusing medium for a period of 5-120 min depending on the experiment. For EPP recordings,

d-tubocurarine chloride (4.20-4.45  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) was added to the Ringer solution to prevent muscle contractions. In some experiments, muscle contractions were prevented by a 30 min closed bath application of  $\alpha$ -bungarotoxin (0.25-0.75  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes, Eugene, Oregon) to block partially and irreversibly ACh receptors. During these experiments, preparations were perfused as indicated above. No curare or  $\alpha$ -bungarotoxin was used for MEPP recordings.

*Calcium imaging of nerve terminals:*

Frogs were anaesthetized using 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma), double pithed and the *pectoralis propius* motor nerve was cut at approximately 1 cm from the *cutaneus pectoris* muscle. The cut end was laid on the thorax of the animal and was washed with a  $\text{Ca}^{2+}$  free Ringer solution (5mM of  $\text{MgCl}_2$ , free  $\text{Ca}^{2+}$ ). The extremity of the nerve was then re-cut and crystals of the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, Calcium Green<sup>TM</sup>-1 dextran, (PM 3000, Molecular Probes, Eugene, Oregon) were then applied at the cut end of the nerve for approximately 15 hours at 22-23°C to allow the migration of the indicator down to the presynaptic terminal. This approach allows a specific observation of  $\text{Ca}^{2+}$  changes in presynaptic nerve terminals. Nerve-muscle preparations were then dissected and pinned in a recording chamber with normal  $\text{Ca}^{2+}$  Ringer solution containing  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BuTx, 2.5  $\mu\text{M}$ , Calbiochem, San Diego, California). Supra-threshold single nerve stimuli were delivered with a suction electrode. Fluorescence variation corresponding to  $\text{Ca}^{2+}$  entry in nerve terminals were recorded using the line scan mode of the Bio-Rad MRC-600 confocal. For each  $\text{Ca}^{2+}$  response, 512 lines were collected with an interval of 2 ms creating an image representing a temporal succession of these 512 lines for a total duration of 1024 ms. Ten  $\text{Ca}^{2+}$  responses were recorded (i.e., 10 stimuli) for control and two series of 10 line scans were collected at 15 and 35 min after constant bath perfusion of glutamate (20 $\mu\text{M}$ ). Preparations were stimulated (0.2Hz) during the entire duration of the experiments.

The Bio-Rad MRC-600 confocal system was equipped with an argon ion laser and a X40 water immersion objective (Plan FL, 0.7 NA, Olympus, Japan). The 488 nm excitation line of the laser was attenuated to 1% of its maximum intensity

using neutral density filters and emitted fluorescence was detected through a long-pass emission filter (cut-off at 515 nm). The results are presented as relative changes in fluorescence intensity ( $\% \Delta F/F = (F - F_{\text{rest}})/F_{\text{rest}} * 100$ ) where the fluorescence intensity that correspond to  $\text{Ca}^{2+}$  variation in the nerve terminals after single nerve stimuli ( $F$ ) was compared to the baseline fluorescence intensity ( $F_{\text{rest}}$ ).

### *Calcium imaging of PSCs*

For  $\text{Ca}^{2+}$  imaging of PSCs and muscle fibers, muscles were dissected from the frogs and incubated for 90 min at room temperature (21°C) in a 10  $\mu\text{M}$  fluo-3 AM solution prepared in normal Ringer solution containing 1% DMSO and 0.02% pluronic acid a non-ionic, low-toxicity detergent that facilitates fluo-3 AM loading. Then, muscles were bathed in normal Ringer solution containing TPEN (tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine, 20  $\mu\text{M}$ ) with 0.01% EtOH. The time course of fluorescence changes in PSCs was monitored using the 488 nm line of the argon ion laser for excitation (attenuated to 1%) of a Bio-Rad MRC 600 confocal microscope, and the emitted light was detected through a long-pass filter at 515 nm. Images (192  $\times$  128 pixels) were acquired every 645 msec before, during, and after glutamate perfusion.

### *Immunohistochemistry of mGluR*

Double labeling mGluR and PNA: Muscles were fixed with formaldehyde 4% for 10 min, and, after rinsing, muscles were incubated for 30 min in a 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution to block endogenous peroxidase activity. Membranes were then permeabilised in 0.3% Triton X solution for 45 min at room temperature. Non specific labeling was blocked by washing the muscles for 10 min with a solution of 2% bovine serum albumin BSA (Fisher, Nepean, Ontario)/ 0.2% gelatin and 0.01% Triton X. Muscles were incubated for a period of 60 min at room temperature with a primary antibody directed against mGluR group II and III (rabbit-anti-mGluR II/III (AB 1553), 1:50, Chemicon International Inc., Temecula, California). This antibody also recognizes group I mGluRs. After a rinsing period, this incubation was followed by an incubation of 60 min at room temperature with a secondary antibody

biotin-sp-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove Pennsylvania). Further amplification was achieved with Vectastain ABC kit (1:500, Vectors, Burlingame, California) for a period of 60 min at room temperature. The mGluR2/3 antibody was revealed using streptavidin AlexaFluor 568 (1:100, Molecular Probes, Eugene, Oregon) for a period of 30 min at room temperature. NMJs were labeled with PNA coupled to FITC (PNA-FITC, 10 $\mu$ g/ml, Sigma) for a period of 30 min at room temperature. Muscles were then mounted in a Slow-fade<sup>TM</sup> medium (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Double labeling mGluR and  $\alpha$ -bungarotoxin: Some experiments were performed as described above but the preparations were labeled with  $\alpha$ -BuTx (see below) instead of with PNA. In another series of experiments, an additional step of amplification for mGluR labeling was performed. In these experiments, the first 3 steps were the same as mentioned above. The blockade solution used was the blocking reagent of the TSA biotin system (PerkinElmer life Science, Boston, MA). Muscles were incubated with the primary antibody directed against mGluR II/III (AB 1553) (rabbit IgG anti-mGluR II/III, 1:100, Chemicon International Inc., Temecula, California) overnight at 4°C. The secondary antibody (donkey-anti-rabbit sp-biotin, 1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) was next incubated for a period of 60 min at room temperature. Amplification was achieved with Vectastain ABC kit (1:200, Vectors, Burlingame, California) for a period of 30 min at room temperature. Further amplification was achieved with Biotynyl tyramide reagent of the TSA biotin system (PerkinElmer life Science, Boston, MA) followed by a second amplification with Vectastain ABC kit (1:200, Vectors, Burlingame, California) for a period of 30 min at room temperature. The biotinylated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody was revealed using Streptavidin- Alexa fluo 568 (1:100, Molecular Probe, Eugene, Oregon) incubated for 30 min at room temperature. NMJs were next labeled with  $\alpha$ -bungarotoxin coupled to Bodipy (1:100, Molecular Probe, Eugene, Oregon) for a 20 min period at room temperature. Muscles were then mounted in a Slow-fade<sup>TM</sup> medium (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Preparations were observed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 510) equipped with a X63 oil immersion objective (PLAN-APOCHROMAT 1.4W) using the multi-track mode. FITC and Bodipy were excited using the 488 nm line of an argon ion laser (attenuated at 0.6-0.8% of its maximal intensity) and AlexaFluor 568 was excited at 543 nm with a helium-neon ion laser (100% intensity). FITC and Bodipy emission was detected through a band-pass filter (505-543 nm) and the AlexaFluor emission was detected through a long-pass filter (cut off 560 nm). This configuration allowed simultaneous visualization of the staining.

*Immunohistochemistry of glutamate transporter (GLAST-1):*

Muscles were fixed with formaldehyde 4% for 10 min and membranes were permeabilized in 0.3% Triton X-100 solution for 45 min. Non-specific labeling was blocked with 2% normal donkey serum (NDS; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) /0.01% triton X-100 diluted in Ringer solution for 30 min followed by an over night incubation, at 4°C, with GLAST antibody (Suarez et al., 2000) (1:250, guinea pig, Chemicon, Temecula, California). PSCs at the NMJ were revealed with the 2A12 monoclonal antibody (Astrow et al., 1998; kindly provided by Dr C.-P. Ko, University of Southern California, USA) for 3 hours at room temperature. A biotinylated conjugated anti-guinea pig IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) and an anti-mouse IgM secondary antibody coupled to FITC (1:500, Sigma) were used to reveal GLAST and 2A12 antibody respectively. Both secondary antibodies were incubated for 60 min each at room temperature. The biotinylated guinea pig secondary antibody was revealed using Streptavidin-Texas-Red (2µg/ml, 30 min, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania). In some experiments, PSCs staining with 2A12 was replaced with PNA coupled to FITC. Muscles were mounted in a Slow-fade™ medium or using a Prolong Kit™ (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Preparations were observed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 510) equipped with a X40 water immersion objective (IR-ACROPLAN 0.8W) using the multi-track mode. FITC was excited using the 488 nm line of an argon ion laser (attenuated at 0.6-0.8% of its maximal intensity) and Texas-Red was excited at 543

line of an helium-neon ion laser (100% intensity). FITC emission was detected through a band-pass filter (505-543 nm) and the Texas-Red emission was detected through a long-pass filter (cut off 560 nm). This configuration allowed simultaneous visualization of the stainings.

#### *Western blot analysis*

The specificity of the GLAST and mGluR antibodies for amphibian tissues was performed using Western blot analysis as described in Descarries et al. (1998) and Georgiou et al. (1994).

#### *Drugs:*

L-glutamic acid was obtained from Sigma. The NMDA receptor antagonist, D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5) was obtained from Tocris Cookson Inc (Ballwin, Montana), Calbiochem (San Diego, California) or RBI (Oakville, Ontario). Non-selective AMPA/Kainate antagonist (referred as non-NMDA antagonist), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), was purchased from Tocris Cookson Inc (Ballwin, Montana) or RBI (Oakville, Ontario). The non-selective group I/II mGluR antagonist (s)- $\alpha$ -methyl-4-carboxyphenylglycine ((s)-MCPG), was obtained from Tocris Cookson Inc (Ballwin, Montana). The agonist (1S,3R)-aminocyclopentanedicarboxylic acid (ACPD) were obtained from Tocris Cookson Inc (Ballwin, Montana). The non-selective glutamate transporter inhibitor, DL-*threo*- $\beta$ -benzyloxyaspartate (TBOA), was purchased from Sigma/RBI. Glutamate, AP5 and TBOA were dissolved in distilled water while CNQX and MCPG were dissolved in NaOH 0.1N and ACPD in NaOH 1N. Stock solutions of AP5 (10mM), ACPD (100 mM) and CNQX (5mM) and TBOA (10mM) were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  while glutamate and MCPG were prepared daily.

### *Statistical analysis:*

One way repeated measures analysis of variance (One Way RM ANOVA) was used when more than two conditions were tested on the same cell. The  $p$  value was corrected with the Bonferroni  $t$ -test to allow multiple comparison versus a control group and were considered significant when  $p < 0.05$ . Student paired  $t$ -test was used to compare the effect of one drug versus its own control when experiments were performed on the same cell.

### **2.1.2.4 RESULTS**

The functionality of a glutamatergic modulation at the amphibian NMJ was examined by studying the modulation of transmitter release and short-term synaptic plasticity as well as the ability of glutamate to activate PSCs.

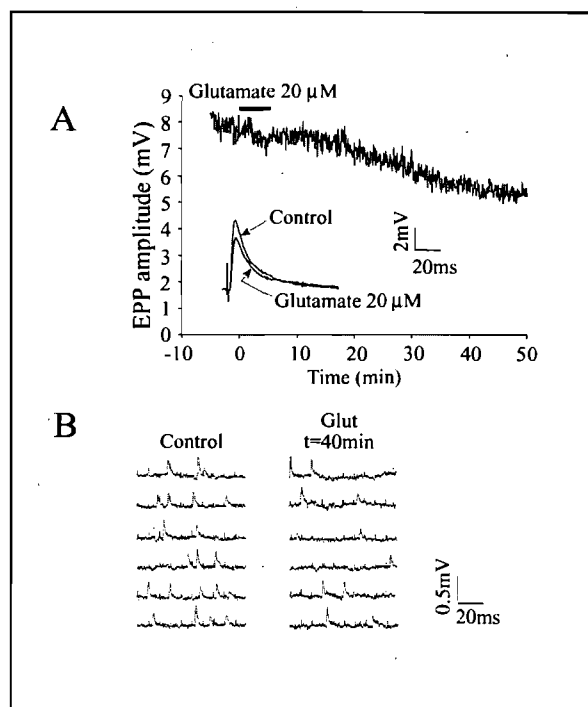
#### *Glutamate reduces transmitter release*

We first determined whether glutamate can affect synaptic transmission. Intracellular recordings of end plate potentials (EPPs) evoked by nerve stimulation (0.2Hz) were performed. Brief bath application (5min) of glutamate (20 $\mu$ M) induced a sustained reduction of EPP amplitude by 23.3 $\pm$ 2.8% (control, 5.57 $\pm$ 0.92mV;  $t=40$  min, 4.18 $\pm$ 0.66mV,  $n=8$ ,  $p < 0.005$ , Student paired  $t$ -test) (Fig. 1A). To determine whether this reduction in EPP amplitude is due to pre- or postsynaptic (or both) mechanisms, spontaneous ACh release of transmitter was studied. The absence of changes in miniature EPP (MEPP) amplitude would argue for presynaptic mechanisms while a reduction in MEPP amplitude would argue for postsynaptic mechanisms. Moreover, a reduction in MEPP frequency would further argue for presynaptic mechanisms. Our results showed that MEPP amplitude was not affected by glutamate (Fig. 1B) (control, 0.55 $\pm$ 0.06mV;  $t=40$ min, 0.61 $\pm$ 0.08mV,  $n=5$ ;  $p > 0.1$ , Student paired  $t$ -test). However, MEPP frequency was reduced by 22.3 $\pm$ 7.4% at  $t=40$  min (Fig. 1B) (control, 4.3  $\pm$ 0.7 Hz; glutamate, 3.3 $\pm$ 0.6Hz,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ , Student paired  $t$ -test). These results suggest that the reduction



of EPP amplitude caused by glutamate was due to a decrease in the release of transmitter by the nerve terminal.

**Figure 1. Exogenous glutamate decreases transmitter release.**



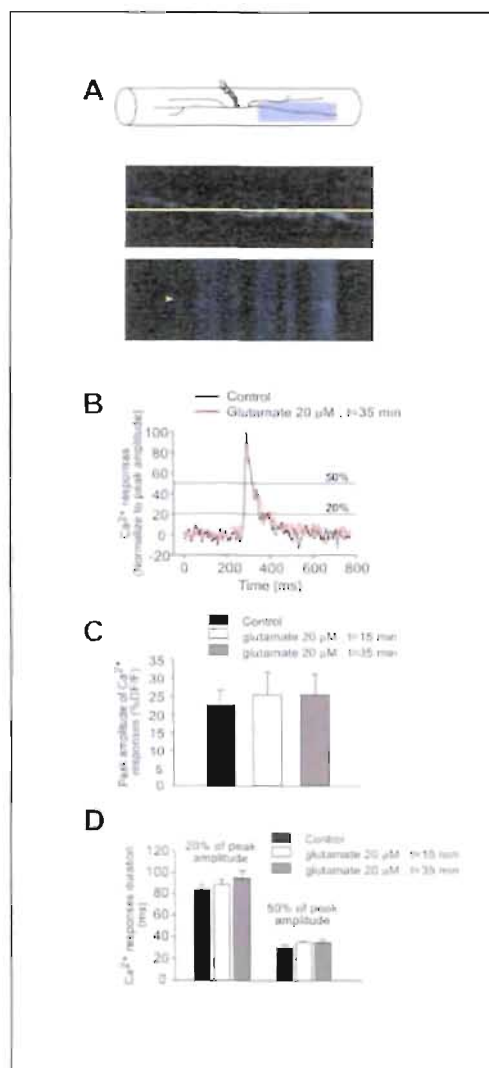
A) Amplitude of EPPs evoked at 0.2Hz before, during and after brief bath application of glutamate (20μM, 5min). Inset: EPP in control and after glutamate application. B) Randomly selected recordings of MEPPs obtained on a non-stimulated preparation before, at 40min after brief bath application of glutamate (20μM, 5min).

### *Glutamate reduced transmitter release without affecting overall presynaptic $Ca^{2+}$ levels*

We next examined whether the glutamate-induced reduction in transmitter release was due to a reduction in  $Ca^{2+}$  entry in the nerve terminal. The  $Ca^{2+}$  indicator Calcium Green-1 Dextran (MW 3000) was specifically loaded into nerve terminals by anterograde transport from the cut end of the nerve. Changes in fluorescence corresponding to  $Ca^{2+}$  entry in the nerve terminal were viewed with a BioRad MRC 600 confocal microscope. After setting a line (width of 0.22μm) on the selected nerve terminal, single nerve stimuli were performed and the  $Ca^{2+}$  variations were recorded under the line corresponding to the region of interest (Fig. 2A).

In these series of experiment, glutamate was perfused during the entire experiment to optimize its effect. Imaging of  $\text{Ca}^{2+}$  entry in nerve terminals revealed that continuous application of glutamate (20 $\mu\text{M}$ ) did not reduce the peak amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  responses induced by single nerve stimuli 15 and 35 minutes after glutamate application (Fig. 2B,C) (control, 22.4 $\pm$ 4.3%; t=15min, 25.4 $\pm$ 6.2%; t=35min, 25.3 $\pm$ 5.9%, n=6,  $p>0.1$ , RM ANOVA). Moreover, the duration of  $\text{Ca}^{2+}$  responses at 20% and 50% of the normalized peak amplitude remained unchanged (Fig.2B,D) (at 20%: control, 85.0 $\pm$ 4.2 ms; t=15min, 89.2 $\pm$ 4.7 ms; t=35min, 95.8 $\pm$ 6.9 ms, n=6,  $p>0.1$ , RM ANOVA and at 50%: control, 31.3 $\pm$ 2.1 ms; t=15min, 35.4 $\pm$ 1.2 ms; t=35min, 35.8 $\pm$ 3.0 ms, n=6,  $p>0.1$ , RM ANOVA) suggesting that the handling and regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  following its entry in presynaptic terminals were unaffected. Similar results were obtained when 500 $\mu\text{M}$  glutamate was used (data not shown). Thus, glutamate reduced transmitter release without affecting overall presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  levels.

**Figure 2. Glutamate does not affect  $\text{Ca}^{2+}$  entry in nerve terminals.**



**Figure 2:** *Glutamate does not affect  $\text{Ca}^{2+}$  entry in nerve terminals.* *A) Upper panel,* false color image showing a branch of a NMJ, at rest, loaded with a fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator (Calcium Green-1 dextran; PM 3000). The yellow line on the NMJ corresponds to the portion of the nerve terminal that was repeatedly scanned to monitor  $\text{Ca}^{2+}$  variations using the line scan mode. The diagram on top illustrates the NMJ shown on this panel, with the region scanned for the image identified by the blue box. *Lower panel:* image showing the temporal succession of the 512 scans of the line shown on the upper panel. The arrowhead shows where the supra-threshold nerve stimulus was induced. Blue corresponds to low levels of  $\text{Ca}^{2+}$  and red corresponds to high levels. *B)* Relative change in fluorescence corresponding to  $\text{Ca}^{2+}$  responses elicited in the nerve terminal by single action potential in control (black) and 35 min following glutamate application (red). *C)* Histogram of relative changes in fluorescence in the nerve terminals. Peak amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  responses, evoked by single nerve stimuli, remained unchanged after constant bath perfusion of glutamate (20 $\mu\text{M}$ ). *D)* Histogram showing that the duration in  $\text{Ca}^{2+}$  elevation in the nerve

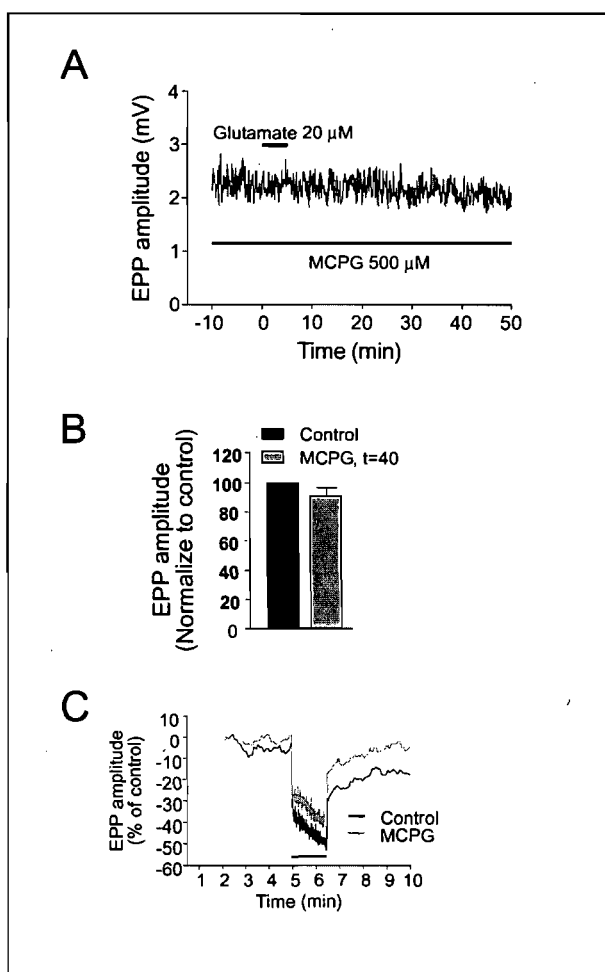
terminal at 20% and 50% (see C) of the peak amplitude remained unchanged at t=15min and at t=35min following constant bath perfusion of glutamate.

### *Endogenous glutamate modulates high frequency-induced synaptic depression*

To consider glutamate as a neuromodulator at the amphibian NMJ, endogenous glutamate should also modulate synaptic activity. Because exogenous glutamate application reduced transmitter release, we tested whether high frequency-induced synaptic depression (Zucker and Regehr, 2002) was modulated by endogenous glutamate. The level of synaptic depression was determined by

measuring the amplitude of the last 50 EPPs of the train of stimuli (10Hz, 80s) and compared to control EPPs. Similar synaptic depression could be obtained repetitively at the same NMJ (Robitaille, 1998). In the presence of MCPG (500 $\mu$ M), high frequency synaptic depression was significantly reduced by 20.3% as compared to control depression (Fig. 3C; control, 38.0 $\pm$ 3.8% and after MCPG, 30.3 $\pm$ 3.6%,  $n=8$ ,  $p<0.05$ , Student paired  $t$ -test). These data indicate that the release of endogenous glutamate modulate synaptic efficacy and short term plasticity at the amphibian NMJ mainly through the activation of mGluR receptors.

**Figure 3. mGluR receptors are involved in glutamate effect**



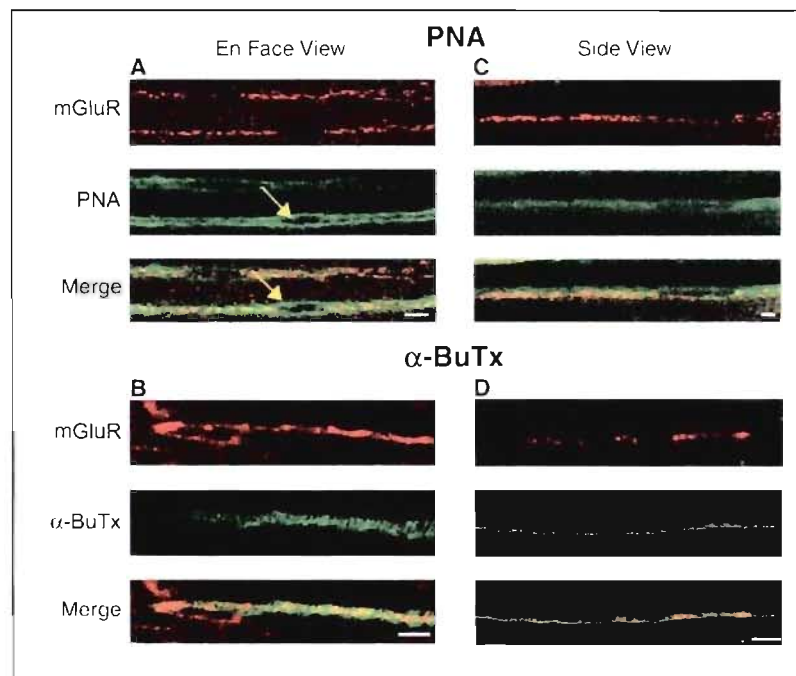
*A*) EPP amplitude before, during and after glutamate application in the presence of the non-selective group I/II mGluR antagonist MCPG (500 $\mu$ M). Note that glutamate effects were abolished in the presence of MCPG. *B*) Histogram illustrating the mean  $\pm$  SEM of the effects MCPG alone on the amplitude of EPP evoked at 0.2Hz. *C*) EPP amplitude (% of control) evoked by nerve stimulation at 0.2Hz (control), during (*bar*) and after high frequency nerve stimulation (10Hz, 80s) in absence (*black trace*) and in the presence of MCPG (500 $\mu$ M, *gray trace*). Note that synaptic depression was less pronounced in the presence of MCPG ( $p<0.05$ ; Student paired  $t$ -test).

### *Localization of mGluRs at the NMJ*

The localization of mGluRs at the frog NMJ was next examined using an antibody that recognizes mGluR group II/III (that are commonly presynaptic, Petralia et al., 1996; Gereau and Conn, 1995) and mGluR group I (that are commonly postsynaptic, Romano et al., 1995). The specificity of the antibody for the frog tissue was confirmed by Western blot analysis that revealed two bands at 100 and 190 KDa (Tanabe et al, 1992; Romano et al, 1996)(data not shown). Labeling of mGluRs (red) was observed within the boundaries of the end plate area represented by the PNA staining (green), thus confirming the presence of these receptors at the NMJ (Fig. 4A). Interestingly, PSCs somata (arrows) indicated by widening of PNA labeling were not labeled by mGluRs antibodies suggesting that these receptors are not abundant in PSCs. To further investigate the location of mGluRs we compared their distribution with the AChRs that were labeled using  $\alpha$ -BuTx (Fig. 4B). Labeling of nAChRs gave the typical banding pattern that represents the clustering of these receptors on the crest of the post-junctional folds, facing active zones in the presynaptic terminal (Robitaille et al., 1990). The staining of mGluRs appears intermingled within the  $\alpha$ -BuTx staining.

The presence of mGluRs was further examined on NMJs located on the side of muscle fibers. If mGluRs are located postsynaptically, mGluRs staining should be located below PNA labeling on the muscular side since PNA is present in the synaptic cleft and around PSCs. Indeed, as shown in Fig. 4C, mGluR staining was located below PNA staining. The presence of mGluRs receptors labeling in muscle fibers was further confirmed by comparing mGluRs labeling and nAChRs staining on side NMJs. If mGluRs are located postsynaptically, one would predict that the two staining should mainly overlap and be aligned on the membrane of the muscle fiber. As shown in Fig. 4D, this was indeed the case, since the two staining are largely superimposed at the edge of the muscle fiber membrane. However, on a few occasions, staining above the AChRs labeling was observed suggesting that mGluRs may be present in presynaptic terminals and/or the PSCs (data not shown). These data indicate that mGluRs are present at the amphibian NMJ, predominantly clustered in the postsynaptic membrane, possibly intermingled with the nAChRs.

**Figure 4. Localization of mGluRs at the NMJ**



A) False color confocal images with an *en face* view of the mGluRs labeling (*red*) and of the PNA-lectin staining (*green*). Images were acquired simultaneously and superimposed (*merge*) to determine their relative distribution at the NMJ. Note that mGluRs labeling is punctated and located within the boundaries of the

NMJ delineated by PNA staining (*merge*). Also, labeling of mGluRs was not observed on PSCs somata (arrows). B) False color confocal images with an *en face* view of the labeling of mGluRs (*red*) and of the nicotinic cholinergic receptors revealed with  $\alpha$ -BuTx-BODIPY (*green*). Note the typical banding pattern of the  $\alpha$ -BuTx staining, within which the mGluRs labeling appears intermingled resulting in a large proportion of yellow pixels observed as a result of the superposition of the two images. C) Side view of a NMJ showing the labeling of mGluRs (*red*) and of the PNA-lectin staining (*green*). Images were acquired simultaneously and superimposed (*merge*). Note that in the *merge* picture that the mGluR labeling is located below the PNA staining (lack of yellow pixels) suggesting the presence of mGluRs in the postsynaptic muscle cell. D) Side view of a NMJ showing the labeling of mGluRs (*red*) and of  $\alpha$ -BuTx staining (*green*). Images were acquired simultaneously and superimposed (*merge*). Note in the *merge* picture that the mGluR labeling is intermingled with the  $\alpha$ -BuTx staining suggesting that mGluRs are clustered at the end-plate area with the cholinergic receptors. Also note that in C and D (side view of NMJs), no labeling of mGluRs was observed above PNA or  $\alpha$ -BuTx labeling, a position that would have indicated the presence of these receptors in presynaptic terminals and PSCs. Scale bars: 20 $\mu$ m.

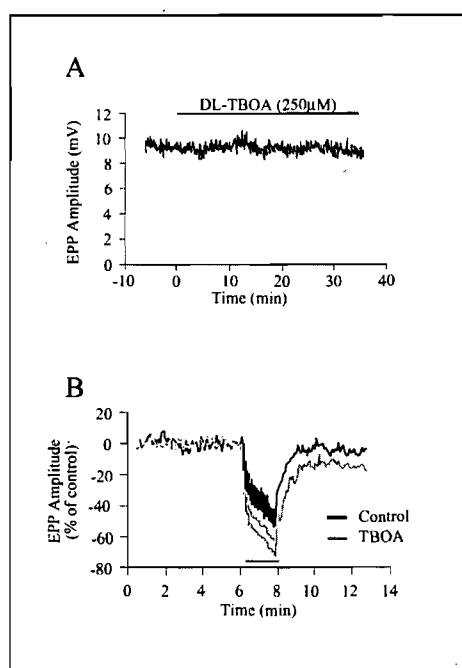
#### *Functional glutamatergic uptake machinery at the amphibian NMJ*

To further test for the physiological relevance of the glutamatergic modulation of transmitter release at this cholinergic synapse, the functionality of a glutamate transporter system was tested. Glutamate transport was blocked using the

glutamate transporter inhibitor DL-*threo*- $\beta$ -benzyloxyaspartate (DL-TBOA) and its effects on transmitter release were monitored. Bath application of TBOA (250 $\mu$ M) did not affect EPP amplitude evoked by 0.2 Hz stimulation (Fig. 5A; control, 10.6 $\pm$ 1.7mV; 30min after TBOA, 9.4 $\pm$ 1.8 mV,  $n=6$ ,  $p>0.05$ , Student paired  $t$ -test). This result is consistent with the observation that GluR antagonists failed to affect EPP amplitude in the same conditions.

Because the release of endogenous glutamate causes part of the synaptic depression, one would predict that blockade of glutamate uptake should lead to a more pronounced synaptic depression due to the accumulation of glutamate. Indeed, in the presence of the glutamate transporter inhibitor (TBOA, 250  $\mu$ M), high frequency-induced synaptic depression (10 Hz, 80s) was significantly increased by 26.6% as compared to control depression (Fig. 5B; control, 38.5 $\pm$ 19.1%; after TBOA, 48.7 $\pm$ 18.3%,  $n=6$ ,  $p<0.05$ , Student paired  $t$ -test). Thus, endogenous glutamate, that modulates synaptic transmission and plasticity at the amphibian NMJ, is efficiently regulated by functional glutamate uptake machinery.

**Figure 5. Functional glutamatergic uptake machinery at the amphibian NMJ.**



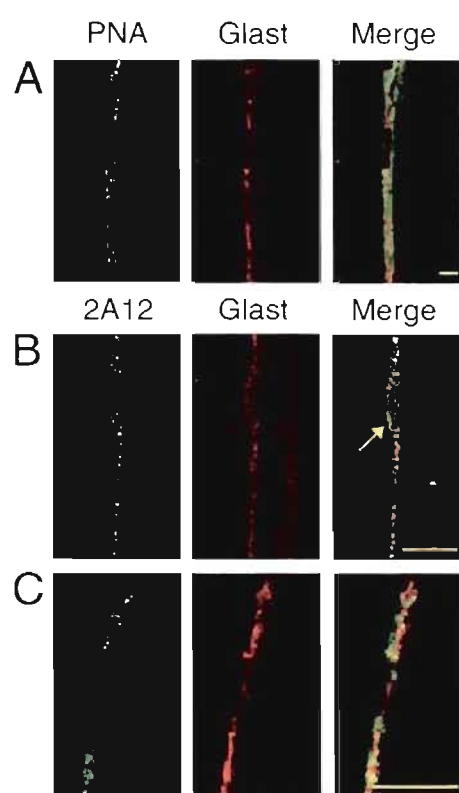
A) EPP amplitude evoked by nerve stimulation at 0.2Hz before and during bath perfusion of the non-specific glutamate transporter inhibitor TBOA (250 $\mu$ M). Note that EPP amplitude remained unchanged after bath application of TBOA. B) EPP amplitude (% of control) evoked by nerve stimulation at 0.2Hz (control), during (*bar*) and after high frequency nerve stimulation (10Hz, 80s) in absence (*black trace*) and in the presence of TBOA (250 $\mu$ M, *gray trace*). Note that synaptic depression was more pronounced in the presence of TBOA.

*The glial glutamate transporter GLAST is present at the amphibian NMJ.*

The localization of glutamate transporter system was next studied. Labeling of the glutamate transporter GLAST-1 (*red*) was located within the boundaries of the end plate delineated by PNA staining (*green*) suggesting that the GLAST transporter is preferentially located at the NMJ (Fig. 6A). Moreover, PSCs somata were clearly labeled. To confirm the presence of GLAST transporter in PSCs, double labeling experiments were performed using the 2A12 antibody (*green*; Fig. 6B) that specifically labels PSCs (Astrow et al., 1998). An overlap between the GLAST (*red*) and the 2A12 (*green*) labeling, revealing yellow pixels would be indicative of a glial location of the GLAST transporter. On the 20 PSCs examined in detail with the 2A12 antibody, 15 PSCs somata and 17 PSC processes were stained with the GLAST transporter antibody and resulted in yellow pixels in the merged confocal images (Fig. 6B; *merge*). Interestingly, evidence was also obtained on 1 NMJ for the presence of GLAST on nerve terminals (Fig. 6C), as suggested by the lack of overlays of the GLAST and 2A12 labeling and by their close proximity. Western blot analysis revealed that the GLAST transporter antibody was specific for amphibian tissues since a single band at ~70kDa was detected (data not shown). This value is similar to the one reported for the GLAST-1 transporter purified from rat brain (66 kDa; Storck et al., 1992).



**Figure 6. The glutamate transporter GLAST is present at the amphibian NMJ.**



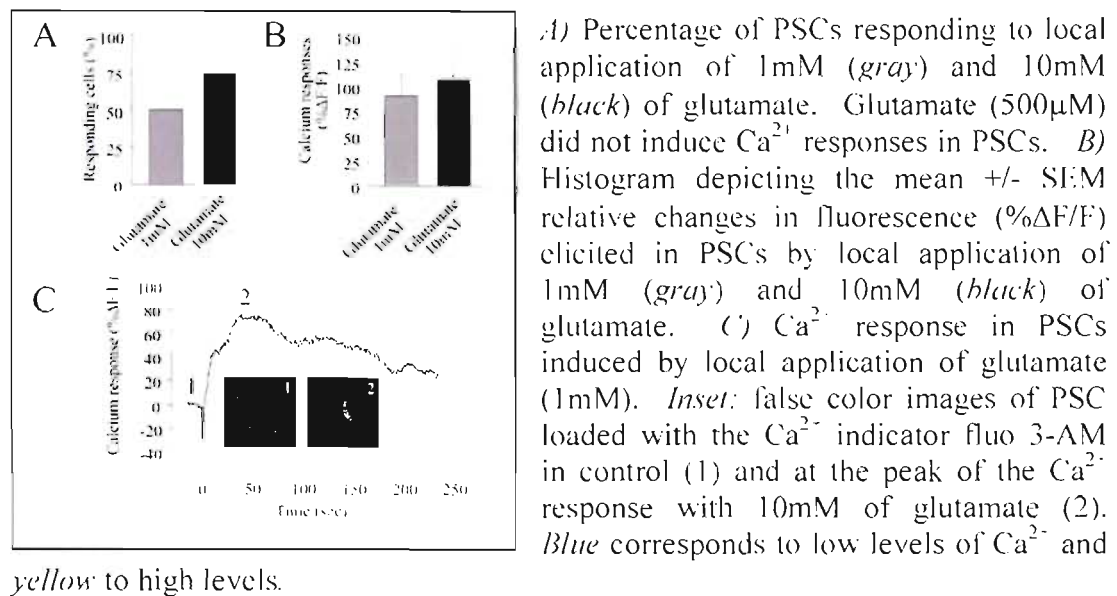
*A)* False color confocal images of the labeling of the GLAST transporter (*red*) and of the PNA-lectin staining (*green*). Images were acquired simultaneously and superimposed (*merge*) to determine their relative distribution at the NMJ. Note that GLAST transporter labeling is surrounded by PNA staining (*merge*) suggesting that GLAST is present at the NMJ. *B)* False color confocal images of the labeling of GLAST transporter (*red*) and of the PSCs revealed with 2A12 antibody (*green*). Note that the two labeling patterns are similar and a large proportion of yellow pixels was observed as a result of the superposition of the two images indicating that the GLAST and the 2A12 staining are co-localized. This pattern of labeling (somata and processes) and the high degree of similarity with the 2A12 staining suggest that the GLAST transporter is located on PSCs at the NMJ. *C)* Side view of a NMJ labeled with 2A12 antibody (*green*) and for the GLAST transporter (*red*). Note in the *merge* picture that the GLAST labeling is located below the 2A12 staining (lack of yellow pixels) suggesting the presence of GLAST in the presynaptic nerve terminal. Scale bars: 20µm.

#### *Do PSC's respond to glutamate application?*

The presence of the glutamate transporter and perhaps of mGluRs on PSCs may indicate that PSCs also are sensitive to glutamate. We tested whether PSCs were sensitive to glutamate by monitoring  $\text{Ca}^{2+}$  changes since glutamate is known to induce  $\text{Ca}^{2+}$  elevation in glial cells (Cornell-Bell et al., 1990; Kim et al., 1994). Local applications of glutamate (500µM in the micropipette, diluted ~20 times by bath perfusion) failed to induce  $\text{Ca}^{2+}$  responses in PSCs.  $\text{Ca}^{2+}$  responses were observed only when large concentrations of glutamate were used, where only half of the cells responded (7/14) with an average  $\text{Ca}^{2+}$  response of  $90 \pm 21\% \Delta F/F$  for 1mM glutamate in the micropipette, while 10mM of glutamate induced  $\text{Ca}^{2+}$

responses in 15 of the 20 cells (75%) with an average response of  $107 \pm 37\% \Delta F/F$  (Fig. 7). These results indicate that large concentrations of glutamate are required to induce small and occasional  $\text{Ca}^{2+}$  responses suggesting that glutamate likely does not efficiently activate PSCs during synaptic activity.

**Figure 7. Large glutamate concentrations are required to induce  $\text{Ca}^{2+}$  responses in PSCs.**



#### 2.1.2.5 DISCUSSION

##### *Glutamatergic modulation at a vertebrate NMJ*

Our data suggest that endogenous glutamate modulates synaptic efficacy and plasticity at the amphibian NMJ. To our knowledge, this is the first direct evidence that activity-dependent release of endogenous glutamate from within a singly innervated cholinergic vertebrate synapse activates functional glutamate receptors, regulates synaptic plasticity and that glutamate levels are regulated by a transporter system that terminates its effects on transmitter release. We can rule out that glutamate originates from other glutamatergic synapses since, unlike invertebrate

NMJs and CNS synaptic networks, there is no direct glutamatergic innervation at the amphibian NMJ. Hence, these results indicate that glutamate is an important modulator of this “*classical cholinergic synapse*” that is the amphibian NMJ.

A possible glutamatergic regulation at the vertebrate NMJ was proposed mainly on anatomical evidence showing the presence of receptors and enzymes (Berger et al., 1995; Grozdanovic and Gossrau, 1998) while the functional evidence available was that exogenously applied glutamate potentiated transmitter release at the immature NMJ (Fu et al., 1995; Liou et al., 1996). However, no functional evidence of endogenous glutamatergic regulation of synaptic transmission at a cholinergic NMJ was yet available.

*Glutamate: neurotransmitter or neuromodulator?*

Our results indicate that glutamate is not involved in the signaling between nerve terminal and muscle fibers as suggested by the observation that neither mGluR antagonist nor the transporter inhibitor affected transmitter release while they significantly perturbed high frequency-induced synaptic depression. This is consistent with the well known observation that ACh receptor antagonists completely block synaptic transmission (Fatt and Katz, 1952), suggesting that glutamatergic EPPs are not produced at this synapse. Our data further suggest that glutamate does not mediate nerve-to-glia signaling as suggested by the weak ability of glutamate to elicit  $\text{Ca}^{2+}$  elevation in PSCs. Indeed, unlike glutamate, neurotransmitters involved in synaptic transmission at this synapse (ACh and ATP) reliably elicit  $\text{Ca}^{2+}$  responses in PSCs, as indicated by the small concentrations of neurotransmitter required to induce responses (nanomolar to low micromolar range) and easily evoked large  $\text{Ca}^{2+}$  responses ( $> 150\% \Delta F/F$ ) in a vast majority of cells ( $> 95\%$ ) (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Rochon et al., 2001). Knowing that  $\text{Ca}^{2+}$  changes in PSCs are key events triggering the regulation of transmitter release by these cells (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001), the unreliability of glutamate to elicit  $\text{Ca}^{2+}$  elevation in PSCs suggests that it does not function as a signaling molecule necessary for PSCs activation. However, one cannot rule out that PSCs are activated by glutamate in a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent

fashion. Hence, our data indicate that glutamate does not act as a direct mediator but rather as a modulator of synaptic events.

Interestingly, there might be a developmental switch in the glutamatergic regulation of transmitter release since, unlike the results at the immature NMJ, our experiments indicate that exogenous application of glutamate depressed transmitter release at the adult NMJ. Consistent with this possibility is that potentiation of transmitter release by exogenous glutamate diminishes with the maturation of the NMJ (Liou et al., 1996). Together, these data suggest that the roles of glutamate may differ depending on the stage of development.

#### *The origin of glutamate release at the NMJ*

The release of glutamate may originate from either the PSCs or the presynaptic terminal, or both, since it is differentially accumulated in these synaptic compartments. As indicated by Waerhaug and Ottersen (1993), it remains to be confirmed whether glutamate is included in synaptic vesicles and released by exocytosis from the presynaptic terminal. However, the frequency-dependence of endogenous glutamate effect is not consistent with a typical presynaptic vesicular release since glutamate receptor antagonists should have affected transmitter release at low nerve terminal activity (low frequency of motor nerve stimulation). A possibility might be that the vesicular concentration of glutamate is small relative to the ACh concentration and, hence, would require the release of the content of several synaptic vesicles in a short period of time, condition induced by a train of stimuli.

An interesting alternative would be that glutamate is released by PSCs in a frequency-dependent manner. Indeed, it was shown that PSCs modulate synaptic plasticity and efficacy at the amphibian NMJ, notably synaptic depression, in a frequency-dependent manner (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2001). This frequency-dependent glial regulation of synaptic depression is consistent with the frequency-dependence of endogenous glutamate modulation of transmitter release. Hence, in this scenario, transmitters released by the presynaptic nerve terminal (ACh, ATP) would activate receptors on PSCs that would lead to the

release of glutamate and the modulation of transmitter release. Furthermore, the presence of the glutamate transporter on PSCs would provide an economical glutamate recycling mechanism.

#### *Localization of glutamate receptors*

The presynaptic effects of glutamate, indicated by the increase in MEPP frequency and absence of effect on MEPP amplitude, suggest that glutamatergic receptors may be located on the presynaptic terminal directly mediating the glutamate effects. Furthermore, our data indicate that a mGluR group I/II antagonist blocked all the effects of exogenous glutamate and significantly reduced synaptic depression while ionotropic glutamate receptor antagonists did not. Hence, these data suggest that the glutamatergic modulation of transmitter release at the amphibian NMJ is mediated by mGlu receptors. The immunohistochemical localization of the mGluRs, although not exclusive, reveals that they are preferentially located on muscle fibers, probably intermingled with the nAChRs at the postsynaptic densities. This seems to be the case also for ionotropic glutamate receptors at the mammalian NMJ (Berger et al., 1995; Grozdanovic and Gossrau, 1998). The possibility that the receptors might also be located presynaptically and/or on PSCs is consistent with the fact the antibody used in this study recognize group II/III and group I mGluRs and that these different subtypes of receptors are known to be differentially located at synapses (Petrálie et al., 1996; Gereau and Conn, 1995; Romano et al., 1995). If indeed the glutamate action is mediated by postsynaptic receptors, it is necessary to propose a model in which an intermediary molecule would convey the final effect of glutamate from the muscle fiber to the presynaptic terminal. An interesting candidate is nitric oxide (NO) since NO synthase is present in muscle fibers (Descarries et al., 1998; Silvagno et al., 1996; Okuda et al., 1997) and since it was shown that NO depresses transmitter release and modulates synaptic depression at the frog NMJ (Thomas and Robitaille, 2001; Lindgren and Laird, 1994).

*A functional glutamatergic uptake machinery is located on PSCs at the NMJ*

Our data indicate that there is a functional uptake machinery preferentially located on PSCs. Consistent with the frequency dependence of mGluRs antagonists on transmitter release, our results indicate that the action of glutamate uptake was only evident during high frequency-induced depression. It is then likely that blockade of glutamate transport by TBOA causes an accumulation of glutamate in the synaptic cleft, resulting in a significant increase in synaptic depression induced by high frequency stimulation. It is noteworthy that the increase in synaptic depression in the presence of the glutamate transporter inhibitor is of the same magnitude than the reduction in depression observed in the presence of the mGluR antagonist. This suggests that the endogenous glutamatergic effects can be solely explained by the actions of mGlu receptors.

Interestingly, the presence of glutamate uptake machinery on PSCs provides them with an additional mechanism in regulating synaptic plasticity. Indeed, not only PSCs would control synaptic efficacy by releasing glutamate but also, by regulating the rate and capacity of glutamate uptake. This would determine the time during which glutamate level remains high and hence, further influence the extent of glutamatergic modulation.

*Model of glutamatergic modulation at the frog NMJ*

As a whole, our data indicate that a complete glutamatergic system regulating transmitter release, is present and functional at the frog NMJ. We propose that glutamate would be released by PSCs and/or by the presynaptic terminal and would preferentially activate mGluRs located on the muscle fibers clustered in the end plate area with the AChRs. Consequent to the activation of mGluRs, a second messenger would be produced and would diffuse retrogradely to the presynaptic terminal, where it would reduce transmitter release as observed during synaptic depression. While these events are taking place, re-uptake of glutamate by PSCs would occur, terminating the effect of glutamate.

These results open a new perspective on synaptic modulations occurring at this synapse and provide a mechanism that explains, in part, the phenomenon of synaptic depression, which is the main plasticity phenomenon at this synapse.

#### 2.1.2.6 REFERENCE LIST

- Astrow, S.H., Qiang, H. & Ko, C.P. (1998) Perisynaptic Schwann cells at neuromuscular junctions revealed by a novel monoclonal antibody. *J Neurocytol* **27**: 667-681.
- Berger, U.V., Carter, R.E. & Coyle, J.T. (1995) The immunocytochemical localization of N-acetylasparyl glutamate, its hydrolysing enzyme NAALADase, and the NMDAR-1 receptor at a vertebrate neuromuscular junction. *Neuroscience* **64**: 847-850.
- Castonguay, A. & Robitaille, R. (2001) Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial  $\text{Ca}^{2+}$  Internal Stores at the Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* **21**: 1911-1922.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S. & Smith, S.J. (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* **247**: 470-473.
- Descarries, L.M., Cai, S. & Robitaille, R. (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* **27**: 829-840.
- Docherty, M., Bradford, H.F. & Wu, J.Y. (1987) Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. *Nature* **330**: 64-66.
- Fatt, P. & Katz, B. (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* **117**: 109-128.
- Fu, W.M., Liou, J.C., Lee, Y.H. & Liou, H.C. (1995) Potentiation of neurotransmitter release by activation of presynaptic glutamate receptors at developing neuromuscular synapses of *Xenopus*. *J Physiol* **489**: 813-823.

- Georgiou, J., Robitaille, R., Trimble, W.S. & Charlton, M.P. (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* **12**: 443-455.
- Gereau, R.W.<sup>4th</sup> & Conn, P.J. (1995) Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J Neurosci* **15**: 6879-6889
- Grozdanovic, Z. & Gossrau, R. (1997) Nitric oxide NMDA signalling in neuromuscular transmission: a missing link in motor end plate diversity and modulation [letter]. *Histochem J* **29**: 267-269.
- Grozdanovic, Z. & Gossrau, R. (1998) Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tissue Res* **291**: 57-63.
- Hepler, J.R., Toomim, C.S., McCarthy, K.D., Conti, F., Battaglia, G., Rustioni, A. & Petrusz, P. (1988) Characterization of antisera to glutamate and aspartate. *J Histochem Cytochem* **36**: 13-22.
- Jahromi, B.S., Robitaille, R. & Charlton, M.P. (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* **8**: 1069-1077.
- Kim, W.T., Rioult, M.G. & Cornell-Bell, A.H. (1994) Glutamate-induced calcium signaling in astrocytes. *Glia* **11**: 173-184.
- Ko, C.P. (1987) A lectin, peanut agglutinin, as a probe for the extracellular matrix in living neuromuscular junctions. *J Neurocytol* **16**: 567-576.
- Lindgren, C.A. & Laird M.V. (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Neuroreport* **5**: 2205-2208.
- Liou, H.C., Yang, R.S. & Fu, W.M. (1996) Potentiation of spontaneous acetylcholine release from motor nerve terminals by glutamate in *Xenopus* tadpoles. *Neuroscience* **75**: 325-331.
- Matteoli, M., Haimann, C. & De Camilli, P. (1990) Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* **37**: 271-275.
- Matteoli, M., Haimann, C., Torri-Tarelli, F., Polak, J.M., Ceccarelli, B. & De Camilli, P. (1988) Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from



- small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7366-7370.
- Okuda, S., Kanda, F., Kawahara, Y. & Chihara, K. (1997) Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in L6 rat skeletal muscle cells. *Am J Physiol* **272**: C35-C40
- Otani, S., Auclair, N., Desce, J.M., Roisin, M.P. & Crepel, F. (1999) Dopamine receptors and groups I and II mGluRs cooperate for long-term depression induction in rat prefrontal cortex through converging postsynaptic activation of MAP kinases. *J Neurosci* **19**: 9788-802.
- Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Neidzielski, A.S. & Wenthold, R.J. (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glia localizations. *Neuroscience* **71**: 949-976
- Robitaille, R., Adler, E.M. & Charlton, M.P. (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* **5**: 773-779.
- Robitaille, R. (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* **15**: 7121-7131.
- Robitaille, R. (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* **21**: 847-855.
- Robitaille, R., Bourque, M.J. & Vandaele, S. (1996) Localization of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* **16**: 148-158.
- Robitaille, R., Jahromi, B.S. & Charlton, M.P. (1997) Muscarinic  $\text{Ca}^{2+}$  responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* **504**: 337-347.
- Rochon, D., Rousse, I. & Robitaille, R. (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* **21**: 3819-3829.

- Romano, C., Sesma, M.A., McDonald, C.T., O'Malley, K., Van del Pol, A.N. & Olney JW (1995) Distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* **355**: 455-469.
- Romano, C., Yang, W.-L. & O'Malley, K.L. (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* **271**: 28612-28616
- Silvagno, F., Xiz, H. & Bredt, D.S. (1996) Neuronal nitric oxide synthase-m, an alternatively sliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* **271**:11201-11208
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. & Stoffel, W. (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10955-10959.
- Suarez, I., Bodega, G. & Fernandez, B. (2000) Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain Res* **859**: 293-302.
- Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R. & Nakanishi, S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**: 169-179
- Thomas, S. & Robitaille, R. (2001) Differential Frequency-Dependent Regulation of Transmitter Release by Endogenous Nitric Oxide at the Amphibian Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* **21**: 1087-1095.
- Vyas, S. & Bradford, H.F. (1987) Co-release of acetylcholine, glutamate and taurine from synaptosomes of Torpedo electric organ. *Neurosci Lett* **82**: 58-64.
- Waerhaug, O. & Ottersen, O.P. (1993) Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* **188**: 501-513.
- Zucker, R.S. & Regehr, W.G. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**: 355-405.

### 2.1.3 DISCUSSION DU DEUXIÈME CHAPITRE

Les études établissant la présence d'éléments structuraux glutamatergiques à la JNM, notamment les transporteurs (plasmiques et vésiculaires), les récepteurs ainsi que les possibles vésicules synaptiques contenant du glutamate, n'avaient à ce jour réussi à démontrer une action synaptique concrète. La présente étude attribue, pour la première fois, à cette machinerie glutamatergique, un rôle dans la transmission et la plasticité synaptique à la JNM. La première portion du premier objectif de ce premier chapitre soit **d'établir la contribution du glutamate sur la transmission et la plasticité synaptique** a été remplie. En effet, les résultats obtenus suggèrent que le glutamate réduit la transmission synaptique par l'intermédiaire des récepteurs de type métabotropes. De plus, les résultats démontrent la présence d'une source endogène de glutamate à la JNM. En effet, l'antagonisme des récepteurs mGluRs provoque une diminution de la dépression synaptique induite par la stimulation du nerf moteur à haute fréquence. De plus, les résultats obtenus démontrent la présence d'un système de transporteur fonctionnel de type GLAST sur les CSPs.

La seconde portion de l'objectif soit de **décrire les mécanismes impliqués dans cette modulation** demeure toutefois hypothétique à ce stade. Notamment, la source du glutamate à la JNM n'a pu être déterminée et pourrait être de nature gliale ou présynaptique. En effet, la contribution gliale comme source de glutamate n'a pas été confirmée bien que la présence des transporteurs sur les membranes plasmiques des PSCs vient appuyer cette hypothèse en offrant un mécanisme de recyclage du glutamate. L'hypothèse de la libération présynaptique de glutamate n'a pas non plus été confirmée ou infirmée bien que la dépendance à la fréquence de l'effet du glutamate appuie cette hypothèse.

D'autre part les données obtenues dans la présente étude démontrent qu'une des cibles du glutamate à la JNM se trouve sur les cellules musculaires et est de nature métabotrope. Toutefois, la démonstration en imagerie calcique de l'insensibilité des cellules gliales à l'application de glutamate n'est pas

nécessairement synonyme de l'absence d'effet du glutamate sur ces dernières. En effet, bien que les réponses calciques reflètent généralement leur activation, les études de Robitaille (1998) démontrent que l'activation des PSCs peut aussi se faire par l'activation des protéines G. Cette étude démontre par ailleurs que l'inhibition des protéines G diminue la dépression synaptique de manière similaire à l'effet observé suite à l'antagonisme des mGluRs. Ainsi, il est possible que le glutamate active les PSCs sans induire de réponses calciques gliales.

Dans un cas comme dans l'autre, les résultats obtenus dans ce premier chapitre démontrent la présence et l'implication du glutamate dans la modulation de la transmission et la plasticité synaptique. Les mécanismes exacts participants à cette modulation par le glutamate demeurent toutefois hypothétiques à ce stade mais seront à la base du second chapitre de cette thèse.

#### **2.1.4 CONCLUSION DU DEUXIÈME CHAPITRE**

Cet article s'insère dans un cadre plus large visant à caractériser les mécanismes de plasticité à la jonction neuromusculaire et particulièrement l'implication du glutamate dans ces phénomènes. Les données obtenues dans cette étude démontrent que le glutamate agit sur des récepteurs de type métabotropes localisés sur le compartiment musculaire. Les analyses quantiques démontrent toutefois que le glutamate génère son effet en agissant sur la terminaison présynaptique. L'implication du glutamate dans la modulation de la transmission synaptique à la JNM semble donc, à prime à bord, compromise. Cependant, les données électrophysiologiques peuvent être réconciliées par l'implication d'une molécule diffusible capable de transporter les effets du glutamate de la fibre musculaire à la terminaison présynaptique. Des molécules diffusibles présentes à la JNM, l'oxyde nitrique semble la molécule désignée pour engendrer les effets à distance du glutamate. Cette possibilité a été évaluée expérimentalement ce qui fera partie intégrante de la prochaine section de la thèse.

## **2.2 DEUXIÈME ARTICLE**

**Modulation glutamatergique nitrinergique-  
dépendante à la jonction neuromusculaire**

### 2.2.1 INTRODUCTION DU TROISIÈME CHAPITRE

Les données qui ont fait l'objet du premier chapitre de cette thèse démontrent la présence d'une machinerie glutamatergique fonctionnelle à la JNM. De plus, les données suggèrent une contribution du glutamate dans la modulation de la dépression synaptique à court terme. Cependant, les données récoltées démontrent une incongruité quant à la présence des récepteurs responsables de l'effet du glutamate et le locus de son expression. En effet, les récepteurs mGluRs sont localisés à la surface des cellules musculaires, tandis que l'effet du glutamate, comme décrit par les études d'analyses quantiques, est présynaptique.

Les similitudes dans les effets du glutamate et du NO sur la transmission et la plasticité synaptique ont fortement dirigé les démarches visant à identifier la molécule responsable de l'effet du glutamate sur la terminaison présynaptique. Notamment, le NO est un médiateur d'effets rétrogrades connu à la JNM (Lindgren et Laird, 1994; Ribera et al., 1998; Aonuma et al., 2000; Thomas et Robitaille, 2001). De plus, la modulation de la dépression synaptique par le NO et le glutamate est d'un même ordre de grandeur, de nature présynaptique et indépendant du calcium (Thomas et Robitaille, 2001). Finalement, la NOS a été identifiée à la plaque motrice par plusieurs groupes de recherche (Nakane et al., 1993; Chao et al., 1996; Kusner et Kaminski, 1996; Yang et al., 1997; Descarries et al., 1998). Ainsi, la première section de ce chapitre tend à répondre à la question suivante : Le NO est-elle la molécule responsable de l'effet du glutamate sur la terminaison présynaptique? L'implication du NO dans la modulation glutamatergique à la JNM a donc été investiguée dans la première portion du second chapitre de cette thèse.

La confirmation de l'implication du NO dans l'effet du glutamate sur la transmission et la plasticité synaptique génère plusieurs questions dont : par quels mécanismes l'activation des mGluRs mène à la production de NO? La littérature déborde d'exemples démontrant la coopération entre l'activation de récepteurs au glutamate de type NMDA et l'activation de la NOS. Cependant, une telle

association entre les mGluRs et la NOS se fait plus rare. Seulement quelques exemples démontrent une production de NO suivant l'activation des mGluRs (Bhardwaj et al., 1997b). La dépendance de la NOS au calcium offre une piste de recherche quant aux mécanismes potentiels impliqués dans son activation par les mGluRs. En effet, tout comme l'activation de NOS par les récepteurs NMDA, l'activation des mGluRs peut être couplée à des mécanismes visant à augmenter transitoirement les niveaux de calcium intracellulaires. Il est bien connu que les mGluRs peuvent modifier les concentrations calciques via une action sur des canaux calciques membranaires ou via les réserves intracellulaires. Notamment, les récepteurs à la ryanodine de type 1 sont activés par leur association avec la protéine Homer, connue pour ses interactions avec les mGluRs, et ce dans les fibres musculaires squelettiques (Duncan et al., 2005). L'activation des RyR1 pourrait ainsi mener à une libération locale de calcium nécessaire à l'activation de la NOS. De plus, l'activation des mGluRs peut, via l'activation de la voie de l'IP<sub>3</sub>, induire une sortie de calcium des réserves intracellulaires (Conn et Pin, 1997). La contribution du calcium musculaire comme agent de transduction impliqué dans l'activation de la NOS par les mGluRs fait ainsi l'objet de cette seconde portion du deuxième chapitre.

Le deuxième chapitre répondra ainsi aux questions soulevées au premier chapitre de cette thèse c'est-à-dire : Par quels mécanismes le glutamate parvient-il à affecter la libération présynaptique d'ACh? Par quels mécanismes intracellulaires les mGluRs activent-ils la NOS? Ce chapitre permettra en plus de confirmer les résultats obtenus dans le premier chapitre notamment en démontrant la présence fonctionnelle de la NOS et des mGluRs au niveau musculaire.

Ces questions sont à la base d'un article soumis dans *European Journal of Neuroscience* dont le texte intégral se retrouve dans la prochaine section de cette thèse et dont la référence complète est :

Pinard A. and Robitaille R. Nitric oxide dependence of glutamate-mediated modulation at a vertebrate neuromuscular junction. Soumis à European Journal of Neuroscience. Numéro de reference EJN-2007-06-12526

\* La contribution de l'étudiante à ce travail : Audrey Pinard a effectué les expériences, leurs analyses, l'interprétation des données obtenues et la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Richard Robitaille.



**2.2.2 ARTICLE DU TROISIÈME CHAPITRE****NITRIC OXIDE DEPENDENCE OF GLUTAMATE-MEDIATED MODULATION  
AT A VERTEBRATE NEUROMUSCULAR JUNCTION**

Audrée Pinard and Richard Robitaille  
Groupe de recherche sur le système nerveux central  
and  
Département de physiologie  
Université de Montréal  
Montréal, Canada  
H3C 3J7

**Address correspondence to:** Richard Robitaille  
Département de physiologie  
Université de Montréal  
P.O. Box 6128, Station Centre-Ville  
Montréal, Canada  
H3C 3J7  
Tel #: (514) 343-6111 ext 1946  
Fax #: (514) 343-2111  
E-mail [REDACTED]

**Running title:** NO-dependent glutamatergic depression at the NMJ

**Key words:** frog, neuromuscular transmission, synaptic plasticity, glutamate, nitric oxide,

**Number of pages:** 28

**Number of words in:** Whole manuscript, 8 221; Abstract, 240; Introduction, 469

**Number of figures:** 7

**Number of table:** 0

### 2.2.2.1 SUMMARY

Recent evidence has revealed a contribution of glutamate in the stereotyped cholinergic neuromuscular transmission. Indeed, receptors, transporters and glutamate itself are present at the NMJ. We previously showed that glutamate activation of metabotropic receptors (mGluRs) decreases synaptic transmission and mediates depression through presynaptic mechanisms. However, we showed that the mGluRs are located postsynaptically, inconsistent with the presynaptic action of glutamate. In the present study, we tested the possibility that nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger mediating the distant effect of glutamate. Glutamate or an mGluR agonist (*trans*-ACPD) failed to reduce synaptic transmission in the presence of the NOS inhibitor (3Br7NINa). Moreover, application of 3Br7NINa precluded the effect of the mGluR antagonist MCPG on high frequency induced synaptic depression. Iontophoretic injections of BAPTA in muscle fibres abolished the effect of *trans*-ACPD on synaptic transmission and blocked the mGluR component of depression indicating that muscular calcium is involved in the mGluR-induced depression. In addition, local application of *trans*-ACPD induced an increase in NO production by muscle fibres visualized with the indicator DAF-FM. This was prevented by 3Br7NINa or the iontophoretic injection of BAPTA. Moreover, motor nerve stimulation (50Hz, 30sec) induced an increase in DAF-FM fluorescence that was abolished by 3Br7NINa and MCPG. Hence, the data suggest that the production of the retrograde molecule NO depends on the postsynaptic calcium-dependent activation of NOS following mGluRs stimulation and is essential for the glutamatergic modulation of synaptic efficacy and plasticity at the NMJ.

#### 2.2.2.2 INTRODUCTION

The neuromuscular junction (NMJ) has long been considered as a relatively simple synapse where ACh was the only purported neurotransmitter released. However, consistent with the concept of co-transmission, there is accumulating evidence showing the presence of a glutamatergic machinery at the NMJ. Indeed, studies have shown at vertebrate NMJs the presence of glutamate transporters (GLAST and GLT) (Pinard et al., 2003; Rinholm et al., 2007), vesicular glutamate transporter (VGLUT) (Boulland et al., 2004), ionotropic (Berger et al., 1995; Grozdanovic and Gossrau, 1998; Todd et al., 2004) and metabotropic (Pinard et al., 2003) glutamate receptors (mGluRs) as well as glutamate itself (Waerhaug and Ottersen, 1993). Importantly, we further showed that this glutamatergic machinery is functional and that endogenously released glutamate modulates synaptic transmission and depression (Pinard et al., 2003). Additionally, it has been shown that motoneurons release glutamate at their central synapses (Mentis et al., 2005; Nishimaru et al., 2005). Hence, it appears that glutamate is a ubiquitous messenger of motoneurons where glutamate is now recognized as a neurotransmitter at motoneuronal synapses and a neuromodulator at NMJs. However, not much is known about the mechanisms underlying the action of glutamate in the modulation of synaptic efficacy and plasticity at the NMJ.

As previously described by Pinard et al., (2003), glutamate affects synaptic transmission and depression via a presynaptic mechanism that depends on postsynaptic activation of mGluRs. Hence, it implies that a retrograde molecule must be produced by the muscle fibre. The present study aims at identifying that molecule and the mechanisms underlying its production. One candidate molecule is NO based on its well known retrograde action on synaptic transmission and depression at the NMJ (Lindgren and Laird, 1994; Ribera et al., 1998; Aonuma et al., 2000; Thomas and Robitaille, 2001). Moreover, the level of NO contribution to synaptic depression observed by Thomas and Robitaille (2001) is similar in amplitude to the one observed with glutamate. Additionally, both NO and glutamate effects are presynaptic but do not affect presynaptic calcium handling. Finally, the

neuronal NO synthase (nNOS) isoform is present at muscle fibre endplates (Nakane et al., 1993; Chao et al., 1996; Kusner and Kaminski, 1996; Yang et al., 1997; Descarries et al., 1998). Interestingly, evidence obtained at the rat hippocampus indicates that mGluR activation leads to the production of NO via a mechanism involving phospholipase C activity and calcium release from internal stores (Bhardwaj et al., 1997). Since nNOS is a calcium-dependent enzyme (Bredt and Snyder, 1990), a calcium elevation could stimulate NOS activation and NO production. Hence, the mechanisms linking mGluRs activation to NO production will be studied focusing on  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanisms.

Using the amphibian NMJ, we report that the presynaptic effect of glutamate on synaptic transmission and plasticity depends on the production of NO whereby glutamate activates postsynaptic mGluRs which stimulate calcium-dependent production of NO by muscular NOS.

### 2.2.2.3 MATERIAL AND METHODS

#### *Preparation*

All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and the Université de Montréal. *Rana pipiens* frogs (Connecticut Valley Biological Supply, Southampton, Massachusetts) were double-pithed and *cutaneus pectoris* muscles and their innervation were dissected. Muscles were then pinned into a recording chamber containing normal Ringer solution (in mM): 120 NaCl, 2 KCl, 1  $\text{NaHCO}_3$ , 15 HEPES and 1.8  $\text{CaCl}_2$ . The pH was adjusted to 7.2 using a solution of NaOH 5M. All experiments were conducted at room temperature (20-23°C) with constant Ringer perfusion at a rate of 1-2 ml/min.

#### *Electrophysiological recordings*

Supra-threshold (2X threshold) stimuli were delivered to the motor nerve via a suction electrode at a frequency of 0.2Hz. Endplate potentials (EPPs) were

recorded using a sharp glass microelectrode (10-20M $\Omega$ , filled with KCl, 2M), amplified 200-1000 times, filtered at 2 KHz with a Warner Scientific amplifier, digitized using Axon instrument 1200 Digidata and acquired using Strathclyde electrophysiology software (J. Dempster, University of Strathclyde, Scotland). In all experiments, membrane potential ( $E_m$ ) of muscle fibres was between -75mV and -95mV and experiments where  $E_m$  depolarized by more than 15mV were excluded. Muscle contractions were prevented by constant perfusion of a Ringer solution containing *d*-tubocurarine chloride (4.20- 4.50  $\mu$ g/ml, Sigma).

Following a control period of 15-30 minutes, drugs were delivered to the whole preparation through the Ringer-curare perfusion solution. In some experiments, drugs were dissolved in a *d*-tubocurarine chloride Ringer solution, loaded in a micropipette (tip diameter of 2  $\mu$ m) and locally applied on single NMJs using a picospritzer (500msec, 20PSI). Synaptic depression was induced using high-frequency trains of motor nerve stimulation (10Hz, 80sec or 50Hz, 30sec). The level of depression was determined by comparing the last 50 EPPs of the train to control EPPs evoked at 0.2Hz before the train of stimuli.

### ***Iontophoresis of BAPTA in muscle fibres***

Iontophoretic injections in muscle fibres of BAPTA analogues were performed by current injection through a sharp glass microelectrode. Current pulses (-10nA, 200msec) were generated at a frequency of 2Hz for a period of 10 minutes using a Grass S88 stimulator. The microelectrode contained KCl (0.5M), BAPTA (10mM, Sigma) and Oregon-Green 488 BAPTA-1 hexapotassium salt (50 $\mu$ M, Molecular Probes). Muscle fibres iontophoretically injected with BAPTA and Oregon-Green 488 BAPTA-1 hexapotassium salt were observed using a 60X water immersion objective (Olympus, LUMPlanF1) on a Nikon Optiphot upright microscope. Images were collected every 500 msec with an intensified CCD camera (SONY) and acquired using MetaFluor imaging software (Universal imaging corp.). Images were acquired before, during, and after BAPTA and Oregon-Green 488 BAPTA-1 injection in the muscle fibre and the quality of the injection was evaluated by measuring changes in fluorescence. Relative changes were expressed as  $\Delta F/F\% =$

$100 \times (F - F_{\text{rest}}) / F_{\text{rest}}$  where  $F$  is the fluorescence of the muscle fibre in a given frame and  $F_{\text{rest}}$  is the average fluorescence measured during the control period. Current injection and EPP acquisition were alternated so that BAPTA injection could be achieved with the recording electrode. An interval of 500 milliseconds was set between iontophoresis injection and recording sessions to allow membrane repolarisation to occur. EPPs were monitored before, during and after iontophoresis as described in the previous section.

### ***NO imaging in the muscle fibre***

Changes in the level of NO in muscle fibres were assessed using the fluorescent indicator DAF-FM. *Cutaneus pectoris* muscles were incubated for 45 minutes at room temperature (20-23°C) in a solution of DAF-FM (10µM) containing 1% DMSO. Following the incubation, muscles were washed in normal Ringer. The time course of fluorescence changes in muscle fibres were monitored using the 488 nm line of the argon ion laser (attenuated to 1%) of a Bio-Rad MRC 600 confocal microscope and the emitted light was detected through a long-pass filter at 515 nm. Images (192 × 128 pixels, at a frequency of 1 Hz) were acquired within the first 5 µm below the surface of the membrane of muscle fibres. Images were acquired before, during, and after local application with a picospritzer of agonists (*trans*-ACPD, 100µM in the pipette, 20PSI, 5sec or S-Nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP, 100µM) or motor nerve stimulation (50Hz, 30sec) in the presence or absence of drugs. An endplate was selected for imaging only if it was possible to clearly visualize the presynaptic terminal, the perisynaptic Schwann cells (PSCs) and the muscle fibre. This criterion ensures that the measurements of DAF-FM fluorescence were performed on areas of the muscle fibre where possible contamination from PSC or nerve terminal fluorescence was minimal. Changes in fluorescence were expressed as  $\Delta F / F\% = 100 \times (F - F_{\text{rest}}) / F_{\text{rest}}$  where  $F$  is the fluorescence of the muscle fibre in a given frame and  $F_{\text{rest}}$  is the average fluorescence measured during the control period. For responsive cells, peak amplitude was obtained by averaging 5 values surrounding the peak response. For a cell to be considered as non-responsive, changes in fluorescence observed in the muscle fibre

had to be lower than 0.5%  $\Delta F/F$ . Since no peak values were obtained in these cases, the values of % $\Delta F/F$  were obtained by averaging the fluorescence for a period of 10 seconds, 5 seconds after the beginning of the treatment. This period corresponds to the time period where the responses were observed in responsive cells.

### ***Drugs***

L-glutamic acid, 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N'-tetraacetic acid (BAPTA) and S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) were obtained from Sigma. 3-Bromo-7-Nitroindazole sodium salt (3Br7NiNa) was obtained from Calbiochem. Oregon green 488 BAPTA-1, Fluo-4 and 5,5'-dinitroBAPTA were purchased from Invitrogen (Oregon). (s)- $\alpha$ -methyl-4-carboxyphenylglycine [(s)-MCPG], (1S;3R)-aminocyclopentanedicarboxylic acid (ACPD) was purchased from Tocris Cookson Inc (Ballwin, Montana). Glutamate and haemoglobin were dissolved in water and prepared daily. MCPG was dissolved in 0.1M NaOH and ACPD in 1M NaOH and stock solutions were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . BAPTA, Oregon 488 BAPTA-1 and 5,5'-dinitroBAPTA were dissolved in a 0.5M KCl solution, 3Br7NiNa was prepared in DMSO (Sigma), kept in the dark and stock solutions were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . SNAP was dissolved in water and stock solutions were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM diacetate) was purchased from Invitrogen and stock solutions were prepared in Ringer and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***Statistical analysis***

Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. In experiments where two sets of data were obtained from the same cell, results were compared using a Student's paired t-test. When two sets of data were obtained from two unpaired groups, results were analysed using repeated measures (RM) ANOVA. The *P* value was at 0.05 (*P* < 0.05).

#### 2.2.2.4 RESULTS

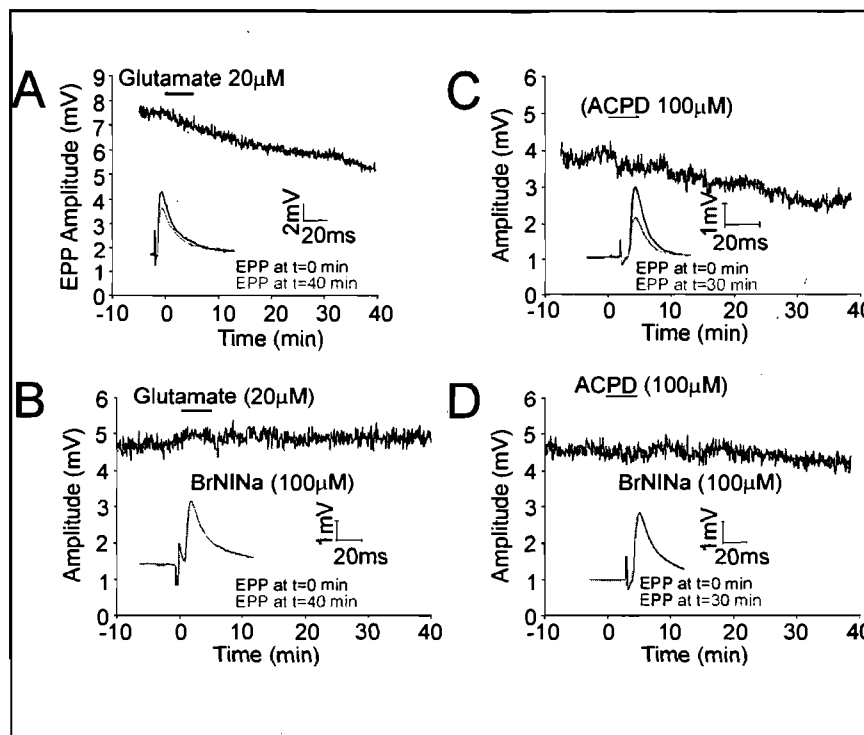
##### ***Exogenous glutamate reduces transmitter release through NO production.***

NO and glutamate share similar characteristics in their effects on synaptic transmission at the frog NMJ where they both reduce synaptic transmission induced by low-frequency stimulation (0.2Hz) of motor nerve terminals. Accordingly, we hypothesised that the action of glutamate depends on the production of NO and thus, impairing NO metabolism should abolish the effect of glutamate on EPP amplitude. As shown in Figure 1A and consistent with the observation by Pinard et al. (2003), we report here that a 5 min bath application of glutamate (20 $\mu$ M) reduced EPP amplitude by 28.6% (control:  $10.7 \pm 1.9$  mV and 40 minutes after its application:  $7.7 \pm 2.0$  mV,  $n=3$ ,  $P<0.05$ , Student's paired  $t$ -test). However, inhibiting nitric oxide synthase (NOS) activity with the neuronal NOS inhibitor 3Br7NINA (100 $\mu$ M) completely blocked the effect of glutamate on synaptic transmission (control at  $t=0$  minutes:  $13.0 \pm 4.5$ mV and 40 minutes after its application:  $12.6 \pm 2.5$  mV,  $n=12$ ,  $P>0.05$ , Student's paired  $t$ -test) (Fig. 1B).

Knowing that glutamate effects at the NMJ are mediated by mGluRs activation (Pinard et al, 2003), we next investigated whether the effect of the mGluR agonist *trans*-ACPD on synaptic transmission (100 $\mu$ M) would be prevented by blockade of NO metabolism. A 5 min bath application of *trans*-ACPD (100 $\mu$ M) reduced EPP amplitude by  $21.9 \pm 3.1\%$  (control at  $t=0$  minutes:  $5.9 \pm 0.5$ mV and 30 minutes after its application:  $4.6 \pm 0.6$ mV,  $n=6$ ,  $P< 0.05$ , Student's paired  $t$ -test) (Fig.1C). However, following bath application of 3Br7NINA (100 $\mu$ M), *trans*-ACPD (100 $\mu$ M) failed to reduce synaptic transmission (control at  $t= 0$  minutes:  $6.1 \pm 0.7$  mV and 30 minutes after its application:  $6.3 \pm 0.9$  mV,  $n=6$ ,  $P>0.05$ , Student's paired  $t$ -test) (Fig. 1D).



**Figure 1** Glutamate effects are NO-dependent



**Figure 1: *Glutamate effects are NO-dependent.*** (A) EPP amplitude induced by 0.2 Hz motor nerve stimulation before, during and after brief bath application of glutamate ( $20\mu\text{M}$ , 5min). Note the reduction in EPP amplitude. (B) EPP amplitude before, during and after brief bath application of glutamate in the presence the NOS inhibitor 3Br7NINA ( $100\mu\text{M}$ ). Note that the effect of glutamate 40 minutes after its application is abolished under these conditions. (C) Brief bath application of the mGluR agonist *trans*-ACPD ( $100\mu\text{M}$ , 5min) reduced EPP amplitude induced by 0.2Hz. motor nerve stimulation. Inset: EPP in control and after *trans*-ACPD application. (D) EPP amplitude before, during and after brief bath application of *trans*-ACPD in the presence of the NOS inhibitor 3Br7NINA ( $100\mu\text{M}$ ). Note that EPP amplitude is unchanged 30 minutes after its application. Insets are examples of EPPs before the agonist application ( $t=0\text{min}$ )(black traces) and 40 or 30 minutes respectively for glutamate and *trans*-ACPD application (gray traces).

Owing to the short delay required for synaptic depression to develop following its induction by sustained stimulation of the motor nerve and its short lasting nature, one should expect that exogenous application of glutamate agonists would produce a short lasting depression that is reversible and repeatable. We tested this possibility by using a local, transient and rapid application of *trans*-

ACPD, thus mimicking the time course that occurs during synaptic transmission. Brief local application of *trans*-ACPD (100 $\mu$ M, 500msec, 20PSI) at the NMJ resulted in the expected rapid and reversible decrease in EPP amplitude of  $43.9 \pm 6.9\%$  ( $n=9$ ) (Fig 2A). Two consecutive local applications of *trans*-ACPD resulted in similar reduction of EPP amplitude. Similar to bath application, the effect of local application of *trans*-ACPD was blocked following bath application of 3Br7NINa (control,  $44.8 \pm 9.4\%$ , 3Br7NINa,  $3.3 \pm 1.8\%$ ,  $n=6$ ,  $P < 0.05$ , Student's paired *t*-test) (Fig. 2B).

These observations indicate that brief application of glutamatergic agonists mimic the effect of endogenous glutamate release during sustained synaptic activity. Furthermore, as a whole, these results indicate that the activity of nitric oxide metabolism is necessary for the glutamatergic modulation to take place.

#### ***Endogenous glutamate mediates synaptic depression through NO production.***

Previous results showed that NO and glutamate are endogenously released during high-frequency stimulation that results in a modulation of short-term synaptic depression (Thomas and Robitaille, 2001; Pinard et al., 2003). We formerly showed (Pinard et al., 2003) that the modulation of depression by glutamate was mediated by mGluR receptors since the mGluR antagonist MCPG decreased synaptic depression. These data were reproduced here where we show that MCPG (500 $\mu$ M) reduced synaptic depression by 14.0% (control  $38.3 \pm 3.1\%$ ; MCPG,  $32.9 \pm 3.9\%$ ,  $n=11$ ,  $P < 0.05$ , Student's paired *t*-test) (Fig. 2C). We then tested whether this mGluR-dependent depression of transmitter release required activation of NOS and the release of NO. In the presence of the NOS inhibitor 3Br7NINa (100 $\mu$ M), MCPG (500 $\mu$ M) failed to affect synaptic depression (control  $51.1 \pm 6.5\%$ ; MCPG,  $55.0 \pm 6.5\%$ ,  $n=10$ ,  $P > 0.05$ , Student's paired *t*-test) (Fig. 2D). This result indicates that the effect of endogenous glutamate on synaptic efficacy and short term plasticity also depends on NO production at the NMJ.

**Figure 2**    **Glutamate modulation depends on NO**

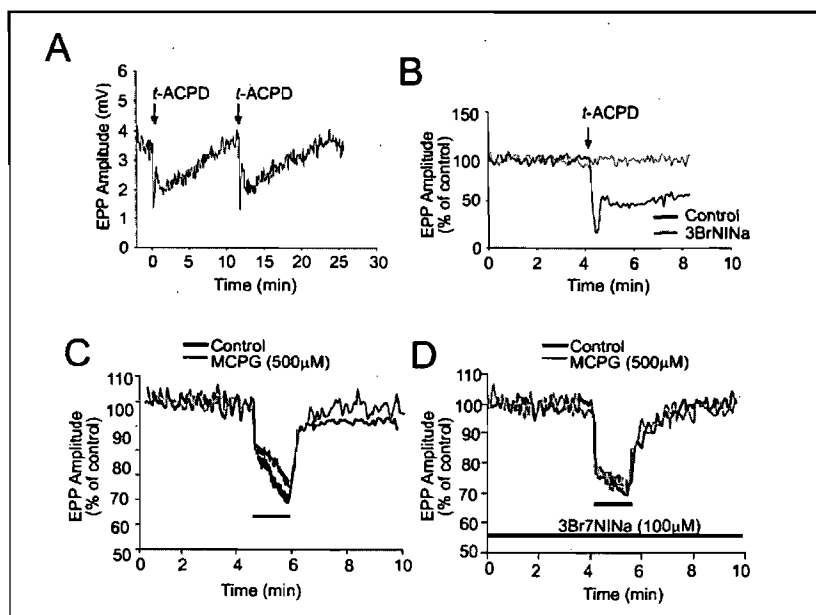


Figure 2: **Glutamate modulation depends on NO.** (A) EPP amplitude induced by 0.2 Hz motor nerve stimulation before, during and after brief local application of *trans*-ACPD (100  $\mu$ M, 20 PSI, 500 msec). This induced a reproducible reduction in EPP amplitude that occurred within seconds of *trans*-ACPD application and that reversed quickly. (B) EPP amplitude before, during and after local application of *trans*-ACPD (100  $\mu$ M, 20 PSI, 500 msec) in control and in the presence of the NOS inhibitor 3Br7NINa (100  $\mu$ M). No depression was observed in the presence of the NOS inhibitor. Arrows indicate the local application of *trans*-ACPD. (C) EPP amplitude (expressed as % of control) evoked by motor nerve stimulation at 0.2 Hz before, during and after high-frequency stimulation (10 Hz, 80 sec) (bar) in the absence (black trace) or presence (gray trace) of the mGluR antagonist MCPG (500  $\mu$ M). (D) EPP amplitude, during and after high-frequency stimulation (10 Hz, 80 sec) (bar) in the absence (black trace) or presence (gray trace) of the mGluR antagonist MCPG (500  $\mu$ M) following application of the NOS inhibitor 3Br7NINa (100  $\mu$ M). No modulation of depression induced by MCPG was observed in the presence of the NOS inhibitor.

### ***Postsynaptic calcium modulates mGluR-induced depression***

We next tested whether NO was produced postsynaptically by the muscle fibre since nNOS and mGluRs are located in the muscle (Descarries et al., 1998; Pinard et al., 2003). In addition, we tested the possibility that the link between

mGluR activation and NO production was  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, since nNOS is a calcium-dependent enzyme (Bredt and Snyder, 1990) and that activation of mGluRs can lead to calcium elevation in cells (Fagni et al., 2000).

We tested the involvement of muscular calcium in the glutamate-mediated modulation by iontophoretically injecting muscle cells with the impermeant calcium buffer BAPTA hexapotassium salt (10mM). Oregon-Green 488 BAPTA-1 hexapotassium salt (50 $\mu\text{M}$ ) was injected simultaneously to visually confirm the quality of BAPTA injection. Visualisation of the extent of Oregon-Green BAPTA labelling was a reliable indicator of BAPTA injection in muscle fibres considering that the concentration of BAPTA in the pipette was 200 times greater than the concentration of Oregon-Green BAPTA and that the two molecules share similar chemical properties. Cells included in this study showed a large diffusion of Oregon Green-BAPTA in the cells that covered the entire endplate area (Fig. 3A). In fact, in all experiments, intense fluorescent labelling was observed throughout the length of the muscle fibre.

We first controlled for possible interference arising from the injection protocol itself. The iontophoresis injection (-10nA pulses of 200 ms for a period of 10min) of the carrier solution (lacking BAPTA and Oregon-Green 488 BAPTA-1 hexapotassium salt) did not affect transmitter release, synaptic transmission or synaptic depression (data not shown). In addition, as shown in Figure 3B, iontophoretic injection of BAPTA (10mM) and Oregon-Green 488 BAPTA-1 hexapotassium salt (50 $\mu\text{M}$ ) into muscle fibres did not affect synaptic transmission when evoked at low frequency (0.2 Hz). Indeed, control EPP amplitude was  $2.78 \pm 0.3\text{mV}$  while it was  $2.5 \pm 0.8\text{mV}$  following postsynaptic injection of BAPTA ( $t = 40$  min) (Student's paired  $t$ -test,  $n=6$ ,  $P>0.05$ ). These results suggest that there is no muscular calcium-dependent modulation of transmitter release when synaptic activity is low and are consistent with our previous observation that glutamate is not produced tonically at the NMJ (Pinard et al., 2003).

We next tested the effect of an mGluR agonist on synaptic transmission in the presence of BAPTA in muscle fibres. Following iontophoretic injection of BAPTA (10mM) and Oregon-Green 488 BAPTA-1 hexapotassium salt (50 $\mu\text{M}$ ) in

the muscle fibre, *trans*-ACPD (100 $\mu$ M) failed to reduce synaptic transmission (control  $2.82 \pm 0.4$ mV,  $t=30$ min  $2.73 \pm 1.1$ mV, Student's paired *t*-test,  $n=8$   $P>0.05$ ) (Fig 3C). This contrasts with the effect of *trans*-ACPD in control condition where a 21.9% reduction in EPP amplitude was observed. These results indicate that the effect of the glutamatergic modulation at the amphibian NMJ depends on the availability of calcium in the muscle fibre and are consistent with the postsynaptic localization of the mGluRs (Pinard et al., 2003).

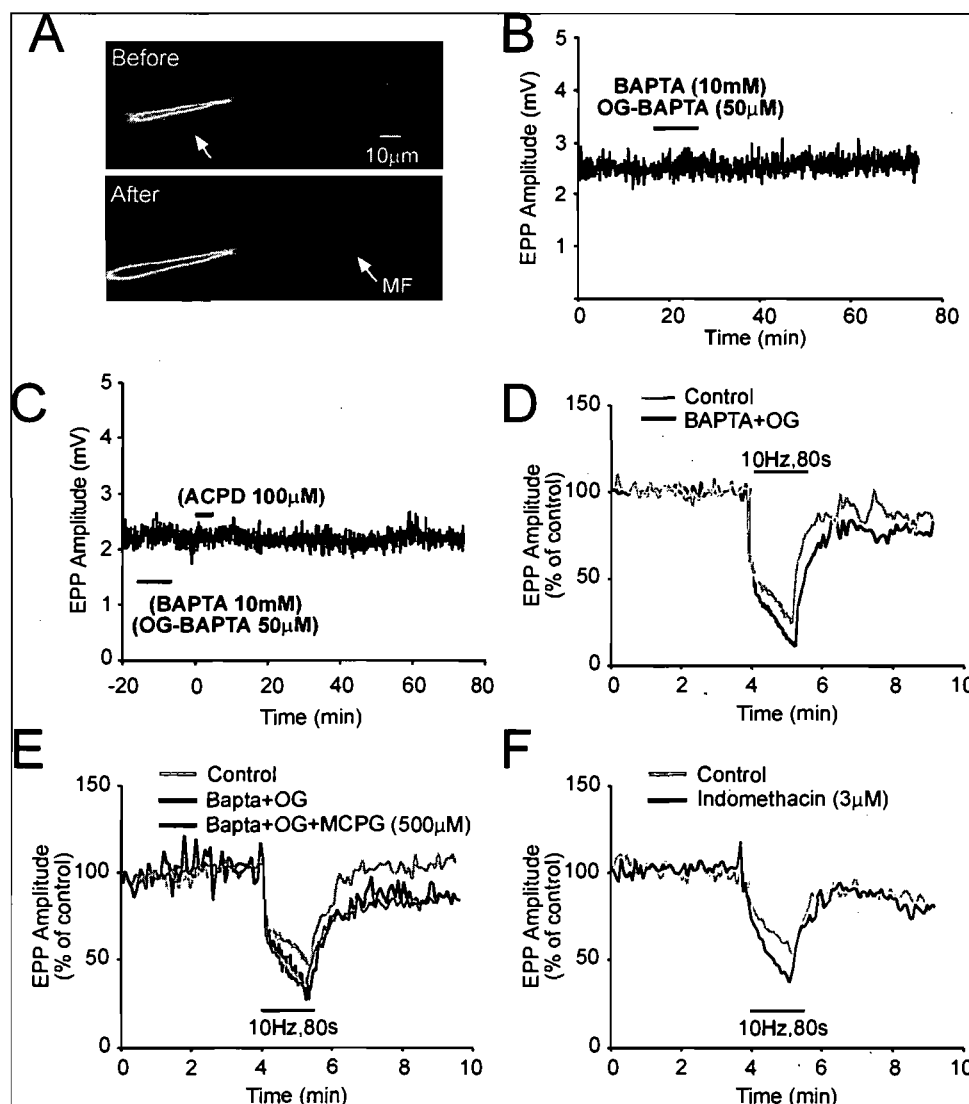
### ***Postsynaptic calcium modulates synaptic depression***

Since we found that NO is necessary for the effect of glutamate on synaptic depression and that postsynaptic  $Ca^{2+}$  is necessary for the mGluR-dependent depression, we next tested the involvement of postsynaptic calcium in mGluR-dependent modulation of synaptic depression. If mGluR activation triggers calcium entry, leading to the activation of NOS and the production of NO, muscular calcium buffering should result in a decrease in synaptic depression mimicking the effect of mGluR blockade. However, contrary to the expected effect, synaptic depression induced by high-frequency motor nerve stimulation (10Hz, 80sec) was significantly increased by  $11.5 \pm 2.1\%$  compared to control (Student's paired *t*-test,  $n=14$ ,  $P<0.001$ ) (Fig 3D). The level of depression in control was  $41.8 \pm 4.1\%$  and  $53.3 \pm 3.9\%$  following BAPTA (50mM) injection. The difference in the recovery of synaptic depression varied between experiments and no consistent effects by any treatments were observed. This variability was observed in other studies (Robitaille, 1998) and seems to be a common feature at this synapse. These results indicate that there is a  $Ca^{2+}$ -dependent postsynaptic mechanism modulating synaptic depression. However, the increase in synaptic depression observed following buffering of muscular calcium suggests the existence of two opposing calcium-dependent mechanisms; one involved in the depression by glutamate and the second, unknown, leading to potentiation.

To specifically determine the contribution of muscular calcium in synaptic depression, we took advantage of the fact that MCPG decreases synaptic depression under normal postsynaptic calcium conditions. Consequently, if mGluR activation

leads to NO production in a calcium-dependent manner, one should predict that the buffering of muscular  $\text{Ca}^{2+}$  should prevent the decrease of synaptic depression observed following bath application of MCPG. As shown in Figure 3E, MCPG had no affect on synaptic depression when muscular calcium is buffered while previous results have shown that under normal calcium condition, MCPG caused a 14.0 % decrease in synaptic depression. Indeed, the level of synaptic depression following calcium buffering was  $57.6 \pm 4.8\%$  and  $56.2 \pm 6.8\%$  in the presence of MCPG ( $500\mu\text{M}$ ) (Fig. 3E). Hence, these results suggest that muscular calcium is necessary for the production of the mGluR-dependent synaptic depression. The calcium dependent potentiating component uncovered following BAPTA injections in muscle fibres is likely to be due to the production of prostaglandins. Indeed, following blockade of COX by indomethacin ( $3\mu\text{M}$ ), we observed an increase in synaptic depression by 45.2% compared to control (Student's paired *t*-test,  $n=5$ ,  $P<0.05$ ) (Fig 3F). The level of depression in control was  $39.4 \pm 8.5\%$  and  $57.1 \pm 7.7\%$  in the presence of indomethacin ( $3\mu\text{M}$ ). This result confirms the potentiating role of prostaglandins on synaptic plasticity at the NMJ (Pappas and Robitaille, 1995).

**Figure 3** Postsynaptic calcium modulates the glutamate effect



**Figure 3: Postsynaptic calcium modulates the glutamate effect.** (A) Fluorescent images showing a muscle fibre before and 15 minutes after the injection with BAPTA (10mM) and Oregon-Green BAPTA (50  $\mu\text{M}$ ). Arrows point to the recording electrode in the upper panel and the muscle fibre (MF) in the lower panel. (B) EPP amplitude evoked by motor nerve stimulation at 0.2Hz was not affected by iontophoretic injection of BAPTA (10mM) and Oregon-Green BAPTA (50  $\mu\text{M}$ ) (gray bar). (C) Bath applied *trans*-ACPD failed to reduce synaptic transmission when calcium was buffered by BAPTA and OG-BAPTA injection into muscle fibres. (D) EPP amplitude (% of control) before (0.2Hz), during (10Hz, 80sec) (bar) and after high-frequency stimulation of the motor nerve terminals in the

absence (black trace) and presence (gray trace) of calcium buffers in muscle fibres. Note that synaptic depression was increased in the presence of the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator. (E) Synaptic depression in control (gray trace), following BAPTA injection (dark gray trace) and following BAPTA injection in the presence of bath applied MCPG. Note that bath application of MCPG no longer reduced synaptic depression following BAPTA injection.

### ***Local application of mGluR agonist triggers muscular NO production***

The results presented above strongly suggest that mGluR activation leads to the production of NO in muscle fibres. To confirm this possibility, we imaged NO using the fluorescent indicator DAF-FM. Images were acquired before, during and after local application of drugs from a micropipette controlled by a picospritzer (Fig 4A). Regions of interest (ROI) were selected on muscle fibres close to a NMJ but on an area free of PSCs and presynaptic terminal branches so that changes in DAF-FM fluorescence are specifically measured in the muscle cell (Fig 4A, B).

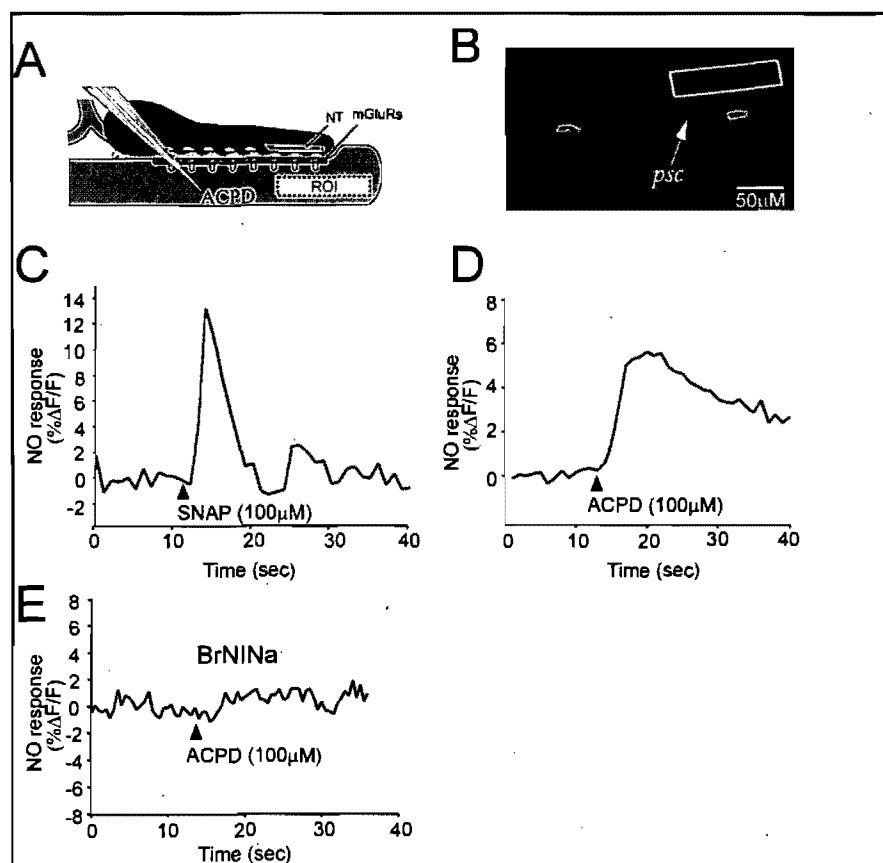
To ensure that DAF-FM effectively detects NO, we locally applied the NO donor SNAP (100 $\mu\text{M}$  in pipette, one pulse of 500 ms at 20 PSI) on NMJs and monitored the changes in fluorescence before and after SNAP application. As shown in Figure 4C, local application of SNAP induced an increase in fluorescence with an average of  $21.4 \pm 3.5 \Delta\text{F}/\text{F}\%$  ( $N=3$ ,  $n=9$ ). Increases in fluorescence were also observed in PSCs upon local application of the NO donor (data not shown).

If mGluR activation can trigger the production of NO in muscle fibres then local application of *trans*-ACPD (100 $\mu\text{M}$ ) should result in a detectable increase in DAF-FM fluorescence. Indeed, local application of *trans*-ACPD (100 $\mu\text{M}$ , 5 sec, 20 PSI) elicited a  $5.5 \pm 0.7 \Delta\text{F}/\text{F}\%$  increase in fluorescence of DAF-FM ( $N=9$ ,  $n=17$ , Fig 4D). Interestingly, *trans*-ACPD only elicited NO production when it was applied at the endplate area and not in more distal regions of the fibres. Furthermore, it did not induce any significant changes in fluorescence in PSCs (data not shown). Importantly, in another set of experiments, *trans*-ACPD-induced NO production was prevented in the presence of the NOS inhibitor 3Br7NINa (100 $\mu\text{M}$ , 30min) where the average response was  $-0.09 \pm 0.1\% \Delta\text{F}/\text{F}$  ( $N=3$ ,  $n=9$ ; RM ANOVA,  $P<0.05$ ) (Fig



4E). These results indicate that the activation of mGluRs leads to NO production that can be visualised in postsynaptic muscle fibres using DAF-FM.

**Figure 4** mGluR dependent production of NO



**Figure 4: *mGluR*-dependent production of NO** (A) Illustration depicting the three elements of the NMJ, the region of interest (ROI) and the micropipette used for local application of drugs. The changes in DAF-FM fluorescence are monitored in a selected ROI on the muscle fibre (black rectangle) devoid of nerve terminals and PSCs. (B) Confocal image of a muscle fibre and an NMJ loaded with the NO indicator DAF-FM. The rectangular box indicates the ROI where the measure of fluorescence is taken. (C) Muscular DAF fluorescence expressed as  $\% \Delta F/F$  before, during and after local application of the NO donor SNAP (1 pulse of  $100 \mu\text{M}$ , 20PSI, 500msec) or (D) *trans*-ACPD (one pulse of  $100 \mu\text{M}$ , 20 PSI, 5 sec). Note the absence of responses when NOS activity was inhibited. Data showed on figures C-E were obtained from different sets of experiments.

### ***Endogenous glutamate triggers muscular NO production***

We next tested whether the release of endogenous glutamate induced NO production using DAF-FM imaging. As shown in Figure 5A, high-frequency stimulation of the motor nerve (50Hz, 30sec) evoked an increase in DAF-FM fluorescence of  $8.1 \pm 1.0 \% \Delta F/F$  ( $N=10$ ,  $n=25$ ). Interestingly, the DAF responses return to baseline in about 15 min (data not showed), a period similar to the duration of the depression induced by local application of t-ACPD application (Fig 2A). Similar results were obtained with 10Hz, 80s train of stimulation although the amplitude of the responses was smaller, making the experimental comparison harder to achieve (data not shown).

In another set of experiments, bath application of the nNOS inhibitor 3Br7NINa ( $100\mu\text{M}$ ) prevented NO production induced by repeated motor nerve stimulation (50Hz, 30sec). Indeed, under this condition the average response amplitude was reduced to  $-0.14 \pm 0.5 \% \Delta F/F$  ( $N=4$ ,  $n=14$ , RM ANOVA,  $P<0.05$ ) (Fig. 5B). We next wondered whether an mGluR antagonist could prevent the increase in DAF-FM fluorescence since we showed that the NO-mediated effects on synaptic transmission and plasticity observed during high-frequency stimulation of the synapse were mGluR-dependent. Bath application of MCPG ( $500\mu\text{M}$ ) prevented NO production induced by high-frequency stimulation of the motor nerve (50Hz, 30sec). Indeed, in the presence of MCPG ( $500\mu\text{M}$ ), the average DAF-FM response was  $-0.07 \pm 0.1 \% \Delta F/F$  ( $N=4$ ,  $n=8$ ), which was significantly smaller than stimulation alone ( $8.1 \pm 1.0 \% \Delta F/F$ ) (RM ANOVA,  $P<0.05$ ) (Fig 5C). These results indicate that endogenous glutamate, released during high-frequency motor nerve stimulation, induces NO production by activating postsynaptic mGluRs.

**Figure 5** Endogenous glutamate stimulates NO production through mGluRs

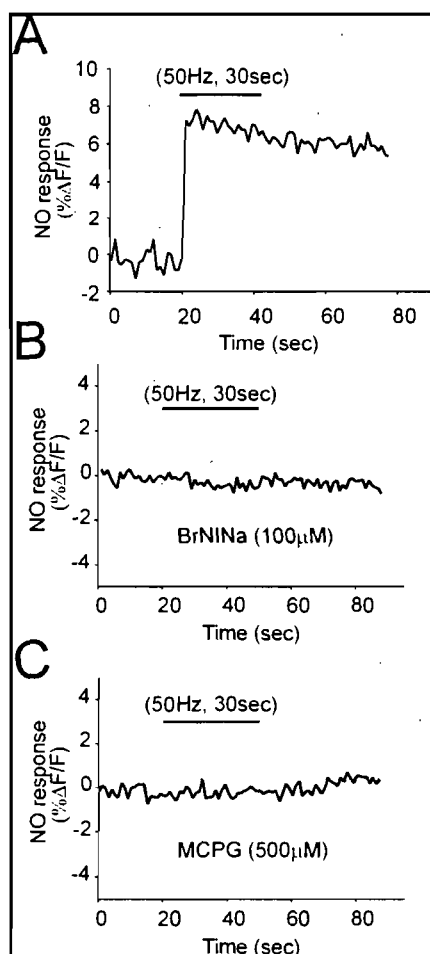


Figure 5: *Endogenous glutamate stimulates NO production through mGluRs* (A) Muscular DAF fluorescence expressed as %ΔF/F before, during (black bar) and after high-frequency stimulation (50Hz, 30sec) of the motor nerve terminal. (B) DAF fluorescence expressed as %ΔF/F before and after high-frequency stimulation (50Hz, 30sec) (black bar) in the presence of the NOS inhibitor 3Br7NINA (100μM) or (C) the broad spectrum mGluR antagonist MCPG (500μM). Note that nerve-evoked production of muscular NO was abolished in the presence of the NOS inhibitor and the mGluR antagonist. Data illustrated in figures A-C were obtained from different sets of experiments.

***mGluRs trigger  $Ca^{2+}$ -dependent NO production in muscles.***

The previous results strongly suggest that NO is produced by muscle fibres following mGluR activation. However, one can argue that NO derives from another cell type present at the NMJ and that NO diffuses from this cell to the muscle fibre. The results showing that postsynaptic calcium buffering affects synaptic depression predict that the production of NO, detected by DAF-FM imaging, should also be abolished by muscular calcium buffering. This was tested by iontophoretic injection of BAPTA into muscle fibres prior to DAF imaging. These experiments were performed on the same NMJs before and after BAPTA injection. In control conditions, two consecutive applications of *trans*-ACPD and two consecutive high-frequency motor nerve stimulations at an interval of 30 minutes induced the same

DAF responses (Fig 6A and 6C respectively). As indicated in Figure 6B, injection of BAPTA into muscle fibres completely abolished the effect of local application of *trans*-ACPD (100 $\mu$ M, 5sec, 20PSI). Control responses were on average  $7.50 \pm 2.0\%$   $\Delta F/F$  and were reduced to  $-0.20 \pm 0.22\%$   $\Delta F/F$  ( $N=5$ ,  $n=5$ ) following BAPTA injection (Student paired *t*-test  $p=0.02$ ). Similarly, NO produced during high-frequency repeated motor nerve stimulation (50Hz, 30sec) was no longer observed following muscle fibre injection with BAPTA (control,  $6.66 \pm 1.2\%$   $\Delta F/F$ ; following BAPTA injection,  $-0.19 \pm 0.2\%$   $\Delta F/F$  ( $N=5$ ,  $n=5$ ) (Student paired *t*-test  $p = 0.008$ ) (Fig. 6B). Importantly, we often observed that high-frequency stimulation could induce an increase in DAF-FM fluorescence in neighbouring non-injected muscle fibres (data not shown). These results clearly demonstrate that NO produced following activation of mGluRs comes exclusively from muscle fibres at amphibian NMJs in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner.

**Figure 6 Muscular calcium chelator blocks NO production**

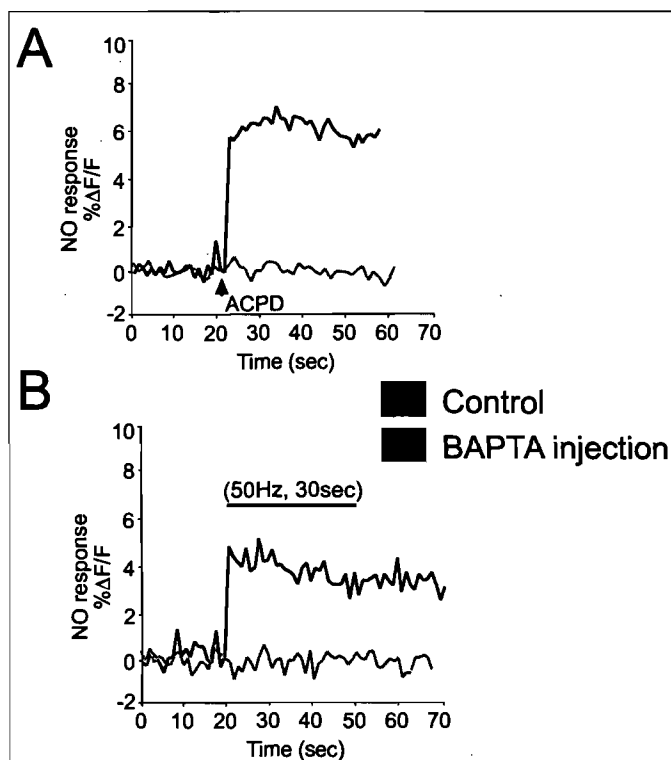


Figure 6: **Muscular calcium chelator blocks NO production.** (A) Paired experiments of muscular DAF fluorescence expressed as % $\Delta F/F$  before, during and after local application of *trans*-ACPD (100mM, 20PSI, 5sec) in control (black trace) and following BAPTA injection in the same muscle fibre (gray trace). (B) DAF fluorescence expressed as % $\Delta F/F$  before, during and after high-frequency stimulation (50Hz, 30sec) of the motor nerve terminal in control (black trace) and following iontophoretic injection of BAPTA in the same muscle fibre (gray trace). Note that postsynaptic  $Ca^{2+}$  buffering abolished the production of

muscular NO.

## 2.2.2.5 DISCUSSION

### *Glutamatergic modulation at the NMJ is NO-dependent*

Glutamate and NO have analogous effects on NMJ function (Thomas and Robitaille, 2001; Pinard et al., 2003), suggesting that they are involved in a common pathway. The present study confirms this possibility by showing that glutamate effects are mediated by postsynaptic mGluRs activation, inducing a calcium-dependent NO production which then causes a depression of transmitter release.

Although the effect of glutamate on synaptic depression is entirely mediated by NO, the reverse does not appear to be the case. Indeed, glutamate is only released when the activity of the synapse is high (>10Hz) (Pinard et al., 2003) whereas NO is also produced under tonic conditions (0.2Hz). Thomas and Robitaille (2001) suggested two different mechanisms for the tonic and activity-dependent effects of NO. The tonic effect appears to be cGMP-dependent whereas activity-dependent NO production is cGMP-independent. Interestingly, Descarries et al. (1998) showed that NOS is also present in PSCs at the NMJ. Hence, a possibility is that NO produced by PSCs could be responsible for the tonic cGMP-dependent action while NO produced under conditions of sustained synaptic activity could be dependent on glutamate and be cGMP independent.

### *Glutamatergic modulation is postsynaptic*

Data obtained in the present study confirm the immunohistochemical evidence from Pinard et al. (2003) suggesting that mGluRs are located on muscle fibres, enriched at end-plates. Indeed, iontophoretic injection of the calcium buffer BAPTA directly into muscle fibres modulated synaptic depression and completely abolished the effect of the mGluR agonist *trans*-ACPD on synaptic transmission. Interestingly, consistent with the enrichment of mGluR at the endplate area observed with immunohistochemistry (Pinard et al., 2003), *trans*-ACPD induced NO production in muscle fibres (visualized with DAF) only when it was applied at the

end-plate and not away from it. This is consistent also with evidence indicating that NOS is more abundant at the endplate area of muscle cells.

In agreement with our BAPTA injection experiments, it was shown at the amphibian NMJ that calcium increases in skeletal muscle triggered NO production by muscular NOS (Etherington and Everett, 2004; Kusner and Kaminski, 1996) which appears to be critical for a form of long-term depression (Etherington and Everett, 2004). They argue that these calcium increases cause calcineurin-dependent dephosphorylation of NOS, resulting in a production of NO that persists after the end of stimulation. Interestingly, a similar mechanism could be responsible for the sustained depression observed following bath application of glutamatergic agonists. This prolonged activation of mGluRs would cause a sustained rise in calcium leading to the activation of calcineurin.

The results obtained from NO imaging further confirm the postsynaptic origin of NO, since local application of the mGluR agonist (*trans*-ACPD), or repeated motor nerve stimulation induced NO production in muscle cells. Due to the diffusible nature of NO one could argue that NO imaged in a muscle fibre was produced by PSCs or surrounding fibres from where it would passively diffuse to the muscle. However, this seems unlikely since no increase in DAF fluorescence was observed in PSCs following local application of *trans*-ACPD or when the focal plane was positioned more than 5  $\mu\text{m}$  inside the muscle fibre. This argues for a limited volume of diffusion of NO that includes the presynaptic terminal. Moreover, if NO was partially or completely deriving from another cell type, lowering calcium concentration in muscle fibres by BAPTA injection would not have completely abolished DAF-FM responses to local application of *trans*-ACPD. Importantly, it is unlikely that the observed changes in DAF fluorescence are contaminated by  $\text{Ca}^{2+}$  level changes in muscle fibres since the NOS inhibitor 3Br7NINa completely abolished the increases in fluorescence induced by local application of *trans*-ACPD or motor nerve stimulation (50Hz). As a whole, these data strongly suggest that NO produced by muscle fibres mediates the glutamatergic depression at the NMJ.

### ***Calcium-dependence of the glutamatergic activation of NO***

Our data are consistent with the known  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of neuronal NOS (Bredt and Snyder, 1990) present in muscle fibres. Indeed, chelating muscular calcium with BAPTA completely abolished the effect of the mGluR agonist on synaptic transmission and blocked the production of NO as revealed by DAF-FM imaging. Moreover, the endogenous glutamatergic modulation of synaptic depression was completely precluded by buffering muscular calcium as indicated by the lack of MCPG effect on synaptic depression following BAPTA injection. However, the constitutive tonic effect of NO (Thomas and Robitaille, 2001) does not appear to be dependent on postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  since BAPTA injection into muscle fibres did not alter synaptic transmission evoked by low-frequency motor nerve stimulation. This result is consistent with the observation that glutamate is produced in an activity-dependent manner, which further suggests that muscular NO metabolism is also activity-dependent.

$\text{Ca}^{2+}$  regulation of NOS by mGluRs may be linked to intracellular calcium stores (ryanodine-sensitive or  $\text{IP}_3$  sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores) via protein-protein interactions with the scaffold protein Homer (Brakeman et al., 1997; Kato et al., 1998). This protein is associated with mGluRs and  $\text{Ca}^{2+}$  channels and is essential for mGluR signalling (Ehrengruber et al., 2004). Another alternative may be that NOS activity is linked to mGluRs via  $\text{IP}_3$  production as suggested by evidence from rat cerebellum where mGluR activation leads to the activation of NOS via PLC and  $\text{IP}_3$ -dependent mechanisms (Okada, 1992; Bhardwaj et al., 1997). Interestingly, it was shown that local increases in calcium can lead to the activation of nNOS and NO production in skeletal muscle (Kusner and Kaminski, 1996). Furthermore, localized calcium elevations are sufficient to induce synaptic depression at developing neuromuscular synapses in culture (Cash et al., 1996). This suggests that, similarly to the association between NMDA receptors and NOS (Kornau et al., 1995; Brenman et al., 1996; Niethammer et al., 1996), mGluRs may also be physically linked to NOS (Brenman et al., 1996; Songyang et al., 1997; Sheng and Sala, 2001). Therefore, small local increases in calcium, triggered by mGluR activation, could be sufficient for NOS stimulation.

The contribution of these small local calcium increases to NOS activation may seem futile compared the robust and prolonged calcium increases observed during muscle contraction. However, it was observed that local near membrane calcium elevations in response to stimulation precedes the large and slow calcium rises from the contraction process (Etter et al., 1996). In addition, only a small proportion of the intracellular calcium involved in muscle excitation-contraction coupling reaches the near membrane surface. Indeed, the diffusion of calcium released from the ryanodine receptors during the excitation-contraction process is limited around their release sites centred on the Z-lines of the sarcomeres and as a consequence, only a small portion of the total amount of calcium actually reaches the membrane (Escobar et al., 1994; DiFranco et al., 2002; Wang et al., 2004; Gomez et al., 2006). Hence, it seems improbable that this source of calcium is involved in the activation of NOS, which is located near the end-plate area.

We hypothesize that the source of calcium involved in these local calcium elevations could then be either an entry of extracellular calcium or the  $IP_3$ -dependent internal stores. The identification of the sub-type of mGluRs would be quite helpful to determine the possible mechanisms of  $Ca^{2+}$  regulation. Unfortunately, the mGluR at the frog NMJ do not follow a typical pharmacological characterization (Pinard et al., 2003). An interesting possibility is related to the contribution of ryanodine receptors. Indeed, a colocalisation of the mGluR binding protein Homer with RyR1 was observed (Brakeman et al., 1997) and that this association stimulates RyR1 (Ward et al., 2004).

### ***Calcium-dependent potentiation at the NMJ.***

The increase in synaptic depression observed following BAPTA injection into muscle fibres (Fig 3D) revealed the existence of a second  $Ca^{2+}$ -dependent pathway activated in muscle fibres. By chelating  $Ca^{2+}$ , both the NOS-mGluRs and the potentiating pathway are inhibited resulting in a net increase in depression. A possible mechanism might involve the release of prostaglandins as they are present with the synthesizing enzyme  $PLA_2$  at the NMJ (Madden and van der Kloot, 1982; Pappas D, 1995). Moreover, experiments conducted in this study strongly suggest



that prostaglandins modulate synaptic depression. Although more experiments are needed to determine the precise roles and mechanisms of action of prostaglandin on synaptic plasticity at the NMJ, it is nonetheless important to reveal the existence of two postsynaptic opposing pathways acting conjointly at the NMJ to regulate synaptic depression.

#### ***Possible sources of glutamate at the NMJ.***

Evidence indicates that glutamate is accumulated in PSCs and nerve terminals (Waerhaug and Ottersen, 1993). The fact that the glutamatergic modulation occurs during sustained, high-frequency stimulation, is consistent with a glial origin of glutamate since PSCs at the NMJ have the ability to modulate synaptic efficacy and plasticity in a frequency-dependent manner (Robitaille, 1998; Auld and Robitaille, 2003). Moreover, the presence of glutamate transporters on PSCs is consistent with a PSC origin of glutamate as this would provide an efficient recycling mechanism for glutamate (Pinard et al., 2003). However, a presynaptic origin for glutamate cannot be readily ruled out albeit the observation that antagonists of glutamate receptors did not affect synaptic transmission at low motor nerve terminal activity. Indeed, the concentration of glutamate in synaptic vesicles may be such that sustained synaptic activity might be necessary for glutamate to reach a sufficient concentration in the synaptic cleft. In addition, consistent with this possibility, the presence of a vesicular transporter for glutamate has been reported in axon terminals of mammalian NMJs (Boulland et al., 2004)) although some evidence contradicts the possible co-localisation of VGLUT with vACh (Mentis et al., 2005).

#### ***Glutamatergic modulation at motoneuronal synapses***

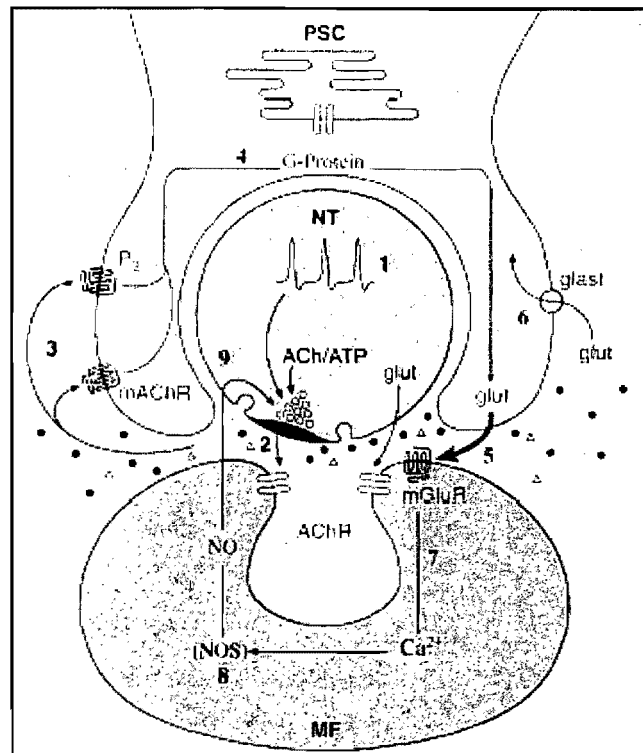
Motoneurons establish cholinergic synapses in the peripheral and central nervous systems and it is now clear that an important glutamatergic regulation is at play at both types of motoneuronal synapses. Indeed, our laboratory has shown (Pinard et al., 2003, and this work) a glutamatergic modulation of the motoneuron-muscle synapses while recent work by Nishimura et al. (2005) also revealed that an

important glutamatergic contribution is present at central motoneuronal synapses. They showed that glutamate is co-released as a neurotransmitter along with ACh contributing to the excitation of Renshaw cells in immature spinal cord. Hence, it appears that a glutamatergic contribution to neurotransmission is ubiquitous at motoneuronal synapses although the mechanisms at play clearly differ between central and peripheral synapses.

***Model of glutamatergic modulation at the NMJ.***

From previously published observations (Pinard et al., 2003) and the results presented in this study, we propose a model of the glutamatergic modulation of synaptic efficacy and plasticity (Fig 7). Considering a glial origin for glutamate, the presynaptic nerve terminal would co-release ACh and ATP (1) during sustained synaptic activity. ACh activates postsynaptic nAChR (2) and PSC receptors (3). PSC G protein-coupled receptor activation would trigger the release of glutamate (4) as suggested by Pinard et al (2003). Alternatively, if glutamate is released presynaptically, the sustained nerve activity would directly induce the release of glutamate. Once glutamate is released it either binds to muscular mGluR (5) or is cleared out of the synaptic cleft by GLAST transporters located on PSCs (Pinard et al, 2003)(6). Metabotropic GluR activation triggers an increase in intracellular calcium in muscle cells (7) leading to the activation of NOS (8) and the consequent production of NO. NO diffuses to the presynaptic terminal where it affects synaptic plasticity (9) (Thomas and Robitaille, 2001).

**Figure 7** Model of the glutamatergic modulation at the frog NMJ



**Figure 7: Model of the glutamatergic modulation at the frog NMJ.** Diagram of an NMJ with the three compartments represented: PSC, nerve terminal (NT) and the muscle fibre (MF). (1) Sustained synaptic activity (2) induces the frequency-dependent release of ACh and ATP in the synaptic cleft (3) leading to the activation of muscarinic and purinergic receptors on PSCs (4) triggering the G-protein dependent release of glutamate. Glutamate could also originate from the presynaptic terminal and be released during the sustained motor nerve activity. Glutamate would then activate postsynaptic mGluRs (5) while being cleared away from the synaptic cleft by glutamate transporters located on PSCs (6). Metabotropic GluR activation would, via a calcium-dependent mechanism (7), lead to the production of NO by the muscular NOS. (8) NO would then diffuse to the presynaptic nerve terminal and contribute to synaptic depression.

As a whole, these data provide an innovative view of motoneuronal cholinergic synapses whereby glutamatergic mechanisms are at play in short-term synaptic plasticity at the NMJ. Glutamate release provides an additional level of refinement of the final output of the nervous system leading to muscle contraction.

### 2.2.2.6 REFERENCE LIST

- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Berger UV, Carter RE, Coyle JT (1995) The immunocytochemical localization of N-acetylaspartyl glutamate, its hydrolysing enzyme NAALADase, and the NMDAR-1 receptor at a vertebrate neuromuscular junction. *Neuroscience* 64:847-850.
- Bhardwaj A, Northington FJ, Martin LJ, Hanley DF, Traystman RJ, Koehler RC (1997) Characterization of metabotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:153-160.
- Boulland JL, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Freneau RT, Jr., Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol* 480:264-280.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:284-288.
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:682-685.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.
- Cash S, Dan Y, Poo MM, Zucker R (1996) Postsynaptic elevation of calcium induces persistent depression of developing neuromuscular synapses. *Neuron* 16:745-754.
- Chao DS, Hwang PM, Huang F, Bredt DS (1996) Localization of neuronal nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 268:488-496.
- Descarries LM, Cai S, Robitaille R, Josephson EM, Morest DK (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* 27:829-840.
- Ehrengruber MU, Kato A, Inokuchi K, Hennou S (2004) Homer/Vesl proteins and their roles in CNS neurons. *Mol Neurobiol* 29:213-227.
- Etherington SJ, Everett AW (2004) Postsynaptic production of nitric oxide implicated in long-term depression at the mature amphibian (*Bufo marinus*) neuromuscular junction. *J Physiol* 559:507-517.
- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular  $Ca^{2+}$  stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23:80-88.
- Grozdanovic Z, Gossrau R (1998) Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 291:57-63.

- Kato A, Ozawa F, Saitoh Y, Fukazawa Y, Sugiyama H, Inokuchi K (1998) Novel members of the Ves1/Homer family of PDZ proteins that bind metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 273:23969-23975.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Kusner LL, Kaminski HJ (1996) Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res* 730:238-242.
- Lindgren CA, Laird MV (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Neuroreport* 5:2205-2208.
- Madden KS, van der Kloot W (1982) At the frog neuromuscular junction prostaglandin synthase inhibitors depress and PGE partially restores quantal acetylcholine release. *Brain Res* 234:464-468.
- Mentis GZ, Alvarez FJ, Bonnot A, Richards DS, Gonzalez-Forero D, Zerda R, O'Donovan MJ (2005) Noncholinergic excitatory actions of motoneurons in the neonatal mammalian spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7344-7349.
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316:175-180.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5245-5249.
- Okada D (1992) Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J Neurochem* 59:1203-1210.
- Pappas D HL, Robitaille R (1995) Arachidonic acid and PGE<sub>2</sub> as possible glial modulators of synaptic activity at the frog neuromuscular junction. In: Society for Neuroscience.
- Pinard A, Levesque S, Vallee J, Robitaille R (2003) Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur J Neurosci* 18:3241-3250.
- Ribera J, Marsal J, Casanovas A, Hukkanen M, Tarabal O, Esquerda JE (1998) Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 51:90-102.
- Rinholm JE, Slettalokken G, Marcaggi P, Skare O, Storm-Mathisen J, Bergersen LH (2007) Subcellular localization of the glutamate transporters glast and GLT at the neuromuscular junction in rodents. *Neuroscience*.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.
- Sheng M, Sala C (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24:1-29.

- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275:73-77.
- Thomas S, Robitaille R (2001) Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1087-1095.
- Todd KJ, Slatter CA, Ali DW (2004) Activation of ionotropic glutamate receptors on peripheral axons of primary motoneurons mediates transmitter release at the zebrafish NMJ. *J Neurophysiol* 91:828-840.
- Waerhaug O, Ottersen OP (1993) Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* 188:501-513.
- Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Haun CK, Askanas V (1997) Immunolocalization of nitric oxide synthases at the postsynaptic domain of human and rat neuromuscular junctions--light and electron microscopic studies. *Exp Neurol* 148:34-44.

### 2.2.3 DISCUSSION DU TROISIÈME CHAPITRE

Les expériences effectuées dans cette portion de la thèse ont réussi à corroborer l'hypothèse de l'implication du NO en démontrant que l'abolition du métabolisme nitrinergique affecte les effets du glutamate sur l'efficacité de la transmission synaptique. Suite à cette démonstration, les mécanismes impliqués dans la collaboration entre le NO et le glutamate se sont avérés d'un intérêt particulier afin de confirmer, notamment, la source du NO à la JNM ainsi que la localisation des mGluRs.

En effet, La présence des mGluRs sur le compartiment musculaire, démontrée en immunohistochimie dans le premier article de cette thèse, a été confirmée indirectement par des études d'iontophorèse et d'imagerie nitrinergique. La dépendance de l'activation de la NOS par le calcium et par les mGluRs a été validée par l'observation que la chélation spécifique du calcium musculaire par le BAPTA abolit, non seulement l'effet synaptique de l'activation des mGluRs, mais aussi la production de NO. Comme l'injection du BAPTA se fait uniquement dans la fibre musculaire, et ce au niveau de la zone active, les mGluRs doivent nécessairement se situer au niveau postsynaptique. De plus, ces expériences démontrent que les mécanismes intracellulaires permettant l'activation de la NOS par les mGluRs nécessitent une contribution calcique. L'activation des mGluRs permettrait une augmentation des concentrations calciques aux abords de la NOS soit par une entrée de calcium du milieu extracellulaire ou via sa sortie des réserves intracellulaires. Une telle organisation a déjà été démontrée pour la coopération entre le récepteur NMDA et la NOS au niveau central.

## 2.2.4 CONCLUSION DU TROISIÈME CHAPITRE

Les données récoltées dans cette section de la thèse, ainsi que les résultats obtenus dans la section précédente, ont permis d'élaborer un modèle de la modulation glutamatergique de la transmission synaptique à la JNM d'amphibien. Selon ce modèle, l'ACh et l'ATP libérés par la terminaison présynaptique, suite à des stimulations à hautes fréquences, activent leurs récepteurs respectifs sur les PSCs. L'activation de ces récepteurs couplés aux protéines G permettrait à son tour la libération du glutamate par ces cellules gliales. Le glutamate se retrouvant ainsi dans la fente synaptique serait sujet à deux sorts soit sa recapture par les PSCs via l'intermédiaire des transporteurs gliaux ou parviendrait à activer les mGluRs musculaires. Cette liaison mènerait, par un mécanisme calcium dépendant, à l'activation de la NOS et la production de NO. Le NO ainsi produit serait libre de diffuser à la terminaison présynaptique pour agir comme messenger rétrograde en diminuant la libération de neurotransmetteurs. Une seconde alternative peut cependant être suggérée et découle de l'incertitude du locus de production du glutamate. Ainsi, il est fort probable que le glutamate parvient aussi entièrement ou partiellement de la terminaison présynaptique. Dans ce cas, l'hypothèse serait que la concentration de glutamate dans les vésicules étant faible, l'unique condition de stimulation à de hautes fréquences permettrait la libération de quantités suffisantes de glutamate pour l'observation de son effet synaptique. Dans un cas ou dans l'autre, les données accumulées dans cette thèse ont permis non seulement de démontrer la présence d'une modulation glutamatergique à la JNM de vertébré classiquement considérée comme purement cholinergique, en plus de proposer des mécanismes d'action pour cette modulation. Davantage de données auront besoin d'être accumulées afin de déterminer la ou les sources du glutamate à la JNM et son mode de libération pour offrir un schéma plus complet de la neurotransmission glutamatergique à la JNM.



### 3 DISCUSSION GÉNÉRALE

Des objectifs fixés dans cette thèse nous avons démontré :

- 1) Que les éléments structuraux impliqués dans la neurotransmission glutamatergique sont fonctionnels à la jonction neuromusculaire. En effet, nous avons démontré que le glutamate est libéré de manière fréquence dépendante et agit sur des récepteurs de type métabotropes localisés sur les fibres musculaires. De plus, nous avons démontré la présence d'un système de transporteurs pour le glutamate localisé sur les cellules de Schwann périssynaptiques.
- 2) Que le glutamate agit en réduisant la transmission et modulant la dépression synaptique via une action indirecte sur la terminaison présynaptique.
- 3) La contribution du NO comme messenger rétrograde de l'effet présynaptique du glutamate sur la transmission et la dépression synaptique. En effet, nos résultats suggèrent que le NO est produit par la fibre musculaire à partir de la NOS suite à la stimulation des récepteurs au glutamate de type mGluRs.
- 4) Que les mécanismes impliqués dans la traduction de l'activation des mGluRs en production de NO sont dépendants du calcium musculaire.
- 5) Finalement, les résultats obtenus nous ont permis d'élaborer un modèle de la modulation de l'efficacité synaptique par le glutamate et le NO à la JNM de grenouille.

Dans cette section de la thèse, l'implication et les conséquences physiologiques de la modulation de la neurotransmission musculaire par le glutamate et le NO seront discutées. De plus, les connaissances acquises par l'intermédiaire des

résultats obtenus dans cette thèse seront incorporées dans le modèle revisité de la neurotransmission à la JNM. D'autre part, les ambiguïtés émanant du modèle proposé, notamment quant à la source du glutamate, seront discutées et différentes hypothèses seront évaluées afin de répondre aux questions irrésolues de cette thèse. Finalement, les perspectives, quant aux avenues de recherche suscitées par les travaux effectués, seront explorées.

### **3.1 COTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE À LA JNM?**

Il est désormais accepté d'affirmer que plusieurs types de neurotransmetteurs sont libérés à une même synapse et de démontrer leur participation à la neurotransmission. Non seulement la cotransmission est fréquente au niveau du SNC, plusieurs études menées dans les dernières années ont aussi démontré la présence de seconds neurotransmetteurs à la JNM. Notamment, de nombreux efforts de recherche se sont consacrés à cotransmission de l'adénosine et de l'ACh. Plus récemment, la présence d'éléments de régulation glutamatergiques a reçu l'attention de plusieurs groupes de recherche et des études ont confirmé la présence de glutamate et de ses récepteurs à la JNM. Ces études démontrent effectivement la présence d'éléments structuraux impliqués dans la neurotransmission glutamatergique chez diverses préparations allant des mammifères à l'organe électrique de la torpille aux préparations d'amphibiens. Cependant, aucune de ces études n'est parvenue à démontrer l'implication de ces éléments structuraux glutamatergiques sur la fonction synaptique. Des études plus récentes démontrent toutefois une contribution du glutamate libéré par les motoneurones mais ce, au niveau de leurs synapses centrales. En effet, ces études démontrent que la libération de glutamate par les terminaisons motoneuronales se fait uniquement sur les cellules de Renshaw parvenant à modifier les propriétés de libération du neurotransmetteur ACh. Alors qu'en est-il de la capacité du glutamate à moduler la neurotransmission musculaire à la synapse neuromusculaire?

### **3.1.1 GLUTAMATE À LA JNM : RÔLE FONCTIONNEL OU VESTIGE ÉVOLUTIF?**

Les expériences menées dans le laboratoire et les résultats provenant de la littérature démontrent la présence de glutamate au niveau des terminaisons présynaptiques et des CSPs (Waerhaug et Ottersen, 1993). Ces données, bien que suggestives, ne démontrent en rien la fonctionnalité du glutamate comme modulateur de la neurotransmission musculaire. En effet, comme introduit à la section 1.4.1, uniquement 20% du glutamate mis en réserve dans les cellules est utilisé à la neurotransmission, la grande majorité servant notamment à la synthèse de protéines (Heath et Shaw, 2002). Ainsi, la démonstration de la présence du glutamate aux synapses non-glutamatergiques n'est pas suffisante afin d'affirmer que ce dernier participe à la neurotransmission. D'autre part, la présence de récepteurs, comme démontrée par plusieurs groupes de recherche (Berger et al., 1995; Grozdanovic et Gossrau, 1997), suggère fortement un rôle dans la fonction synaptique. Aucune de ces études n'a pourtant démontré directement la fonctionnalité de ces récepteurs à la synapse. La présence des éléments structuraux glutamatergiques n'est donc pas suffisante afin d'établir la contribution du glutamate à la synapse. La présence d'éléments structuraux glutamatergiques chez les vertébrés pourraient uniquement être un vestige phylogénique compte tenu que la neurotransmission musculaire est glutamatergique chez les invertébrés.

Pour ces raisons, la démonstration de la capacité du glutamate à modifier la neurotransmission musculaire est essentielle afin de le qualifier de cotransmetteur ou neuromodulateur à la JNM. Les résultats obtenus dans cette thèse démontrent que l'application d'agoniste des mGluRs parvient à affecter la transmission synaptique et ce, lors de stimulation à hautes et basses fréquences. Ces expériences confirment la présence de récepteurs fonctionnels au glutamate à la JNM capables de modifier la transmission synaptique. Elles ne permettent toutefois pas de déterminer si le glutamate y est libéré de manière endogène sous des conditions physiologiques. L'application d'antagonistes des récepteurs de type mGlu a permis de répondre à cette question. En effet, nous avons démontré que le glutamate est libéré à la JNM

uniquement lors de conditions de stimulation répétées et soutenues. L'hypothèse que la présence d'éléments glutamatergiques structuraux à la JNM soit uniquement un vestige phylogénique n'est donc pas appuyée dans cette thèse. Le glutamate aurait plutôt un rôle neuroactif à la JNM d'amphibien.

### **3.1.2 GLUTAMATE : NEUROTRANSMETTEUR OU NEUROMODULATEUR?**

La question de l'origine du glutamate à la JNM est une question importante à laquelle une réponse doit être apportée afin de comprendre les mécanismes glutamatergiques mis en œuvre à la JNM. Il existe essentiellement deux sources possibles de glutamate à la JNM; la terminaison présynaptique et les cellules de Schwann périssynaptiques.

La présence de glutamate, possiblement dans des vésicules synaptiques, au niveau de la terminaison motoneuronale a été démontré par le groupe de (Waerhaug et Ottersen, 1993). Dans la présente étude, plusieurs lignes directrices suggèrent la capacité de la terminaison à libérer du glutamate. De plus, comme mentionné précédemment, les caractéristiques de l'effet du glutamate sur la transmission synaptique, notamment sa dépendance à la fréquence, suggèrent deux choses : que le glutamate n'est pas libéré lorsque la synapse stimulée à de basses fréquences (0.2Hz) ou que la concentration libérée dans ces conditions est si faible qu'elle n'est pas détectée par les enregistrements électrophysiologiques. Les stimulations plus intenses permettraient toutefois une libération suffisante de glutamate expliquant l'effet de l'antagonisme des récepteurs Glu lors de stimulations à de hautes fréquences. On observe toutefois un effet plus important du glutamate lorsque celui-ci est appliqué de manière exogène (20 $\mu$ M). En effet, lors de stimulations hautes fréquences la contribution glutamatergique est moindre suggérant que le glutamate n'atteigne pas des concentrations aussi élevées.

La seconde entité cellulaire potentiellement responsable de la libération du glutamate à la JNM serait formée des CSPs. En effet, il est maintenant bien accepté

que les cellules gliales sont capables de modifier activement les propriétés synaptiques en agissant sur les éléments pré et post-synaptiques. La modulation gliale passe généralement par la libération de gliotransmetteurs dont le plus fréquemment rencontré est le glutamate. Les cellules gliales sont sensibles à l'activité synaptique et y répondent par des élévations de leurs niveaux de calcium intracellulaire. Dans le cas qui nous intéresse, le glutamate pourrait servir de messenger glial agissant sur la transmission synaptique. La libération de glutamate par les CSPs pourrait être stimulée par l'activation de récepteurs localisés sur leur membrane. Des études menées par (Robitaille, 1998), démontrent que l'inhibition des protéines G gliales génère un effet synaptique semblable au blocage de l'effet du glutamate. Il est ainsi envisageable que l'activation des récepteurs gliaux couplés aux protéines G, notamment les récepteurs purinergiques et muscariniques, puisse stimuler la libération de glutamate par les CSPs. De plus, nous avons démontré la présence de transporteurs pour le glutamate sur la membrane plasmique des CSPs. Cette localisation synaptique spécifique serait d'autant plus appropriée en considérant les cellules gliales comme source du glutamate. En effet, les transporteurs offriraient une voie efficace pour le recyclage du glutamate. La dépendance à la fréquence du glutamate sur la synapse peut aussi être défendue en considérant les CSPs comme source du glutamate. La moindre quantité d'ACh et d'ATP libérée à basse fréquence ne permettrait pas l'activation de leurs récepteurs gliaux respectifs tandis qu'une stimulation plus intense permettrait une activation des CSPs et la libération subséquente du glutamate.

Finalement, les deux compartiments pourraient très bien avoir une action concertée sur la libération de glutamate mais des études plus approfondies seraient nécessaires afin de démontrer leurs contributions respectives. L'identification de la protéine VGLUT comme transporteur vésiculaire essentiel à l'emballage du glutamate dans les vésicules synaptiques a grandement facilité l'identification des synapses glutamatergiques. La présence des VGLUT dans l'une et/ou l'autre de ces structures viendrait confirmer la ou les sources de libération du glutamate à la JNM.

Le glutamate agit-il donc à la JNM comme un neurotransmetteur, un cotransmetteur, un gliotransmetteur ou un neuromodulateur? Afin d'être considérée comme un transmetteur, une substance doit avoir une action synaptique directe entraînant une réponse de l'effecteur postsynaptique. Ceci n'est pas le cas du glutamate. En effet, la transmission synaptique à la JNM est purement cholinergique et le blocage des récepteurs cholinergiques nicotiniques abolit entièrement la neurotransmission. Il serait ainsi impertinent et inapproprié de considérer le glutamate comme un neurotransmetteur à la JNM d'amphibien. La définition d'un neuromodulateur est plus appropriée. En effet, un neuromodulateur est décrit comme une molécule possédant plutôt une action régulatrice s'exerçant sur la libération de neurotransmetteurs. Il serait donc plus juste de qualifier le glutamate de neuromodulateur.

Cependant, la réponse à la question posée dans le titre de cette sous-section n'est pas entièrement résolue. L'information manquante étant l'identification de la source du glutamate à la JNM. Afin de répondre à cette question d'autres expériences devront être effectuées. Notamment, le marquage en immunohistochimie des transporteurs vésiculaires donnerait une bonne idée de la présence de vésicules glutamatergiques à la JNM. Des résultats préliminaires du laboratoire démontrent la présence de VGLUT à la jonction bien que des expériences complémentaires devront être effectuées afin de déterminer leur localisation synaptique exacte.

### **3.2 LE NO COMME MODULATEUR ENDOGÈNE À LA JNM**

La section précédente de la discussion met l'emphasis sur le rôle du glutamate comme neuromodulateur. Le glutamate n'est cependant pas l'unique modulateur agissant sur la JNM. En effet, les travaux de Thomas et Robitaille (2001) ont détaillé les propriétés régulatrices du NO sur la transmission et la dépression synaptique. En examinant de près les effets notés par ces auteurs et ceux obtenus

dans le deuxième chapitre de cette thèse, la similitude entre les effets du NO et du glutamate est facilement mise en évidence. Effectivement, les effets des deux molécules sur la neurotransmission musculaire sont très semblables. Toutes deux réduisent de manière fréquence-dépendante la transmission et la dépression synaptique en agissant sur la libération de l'ACh et ce, sans affecter les taux de calcium présynaptique.

Une différence majeure existe toutefois entre les effets de ces deux molécules. En effet, le NO est libéré de manière tonique à la JNM, comparativement au glutamate, lequel est libéré uniquement en conditions de stimulation intense. Une portion de la production du NO serait donc sous la gouverne du glutamate tandis qu'une portion restante serait indépendante du glutamate. À la lumière d'expériences menées dans le laboratoire, il semblerait que la nNOS soit aussi localisée dans les CSPs (Descarries et al., 1998). Cette NOS pourrait ainsi être responsable de la production tonique de NO. De plus, selon Thomas et Robitaille (2001) le NO produit de manière tonique aurait comme cible la GC présynaptique et agirait ainsi sur la libération d'ACh via un mécanisme GMPc-dépendent. Pour sa part, la contribution nitrinergique dépendante du glutamate agirait sur la libération d'ACh via des mécanismes GMPc-indépendants. L'un de ces mécanismes serait la nitrosylation directe par le NO de protéines impliquées dans l'exocytose. Dans un cas comme dans l'autre, le NO servirait de messenger rétrograde visant à limiter la libération d'ACh.

### **3.2.1 MÉCANISMES PROBABLES D'ACTION DU NO SUR LA TERMINAISON**

Depuis la découverte de l'implication du NO dans la modulation de la neurotransmission, de nombreuses cibles du NO ont été identifiées. En effet, le NO, par l'intermédiaire de son action sur la GC et la production de GMPc, affecte les PKG, les phosphodiesterases et les canaux régulés par les nucléotides cycliques (voir section 1.5.2.1). En règle générale, l'action du NO sur la transmission synaptique

dans le SNC en est une potentialisatrice et le NO joue notamment un rôle important dans la PLT en agissant comme messager rétrograde. Le NO y agit entre autre en modifiant la cinétique d'endocytose et de recyclage des vésicules synaptiques. Lorsqu'il y déprime la transmission synaptique, il agirait plutôt par l'intermédiaire de la PKG et sur la sensibilité des récepteurs AMPA des synapses glutamatergiques.

Au niveau de la JNM, le NO a été démontré comme molécule inhibitrice de la libération calcium-dépendante de neurotransmetteurs (Lindgren et Laird, 1994; Wang et al., 1995; Ambiel et Alves-Do-Prado, 1997; Thomas et Robitaille, 2001). La contribution du NO à la neurotransmission musculaire, investiguée dans cette thèse, est double. Lors de stimulation à basse fréquence, le NO est produit de manière tonique et son action est GMPc dépendante mais n'affecte pas la gestion du calcium dans la terminaison présynaptique. La résultante de cette production est une diminution tonique de la libération de l'ACh. Ceci suggère que potentiellement toutes les cibles de la GMPc n'affectant pas la gestion du calcium sont susceptibles de contribuer à l'activité synaptique du NO. De ces derniers mentionnons, les phosphodiesterases et la voie de signalisation des nucléotides cycliques (se référer à la **figure 8** du premier chapitre).

Pour sa part, les effets du NO impliqué dans la modulation de la transmission synaptique lors de stimulations plus intenses sont GMPc-indépendants. La nitrosylation de protéines impliquées dans l'exocytose semble le mécanisme le plus probable impliqué dans la diminution de la libération de l'ACh sous ces conditions.

### **3.3 COOPÉRATION DU NO ET DU GLUTAMATE SUR L'EFFICACITÉ SYNAPTIQUE.**

La neurotransmission musculaire est caractérisée en partie par un facteur de sécurité élevé faisant de la JNM l'une des synapses les plus fiables du système



nerveux. Le facteur de sécurité neuromusculaire élevé réfère à l'habilité de la JNM de rester efficace sous des conditions physiologiques variées. Ceci est le résultat d'une quantité excédentaire de neurotransmetteurs libérée par rapport à la quantité nécessaire afin de déclencher le potentiel d'action. Compte tenu de cette quantité excédentaire de neurotransmetteurs, une modulation causant uniquement une faible diminution dans la quantité de neurotransmetteurs libérés passera inaperçue. En effet, si l'excédant libéré est supérieur à la diminution, le potentiel seuil pour l'émission du PA sera tout de même atteint, masquant ainsi l'effet de la modulation. Afin d'étudier les effets du NO et du glutamate à la JNM et de passer outre cette propriété de la JNM, nous avons utilisé des conditions d'enregistrement visant à abaisser les niveaux d'activation des nAChR. Sous ces conditions, les faibles variations de la quantité de neurotransmetteurs libérés ont pu être observées. Nous avons ainsi pu mettre à jour l'effet du NO et du glutamate sur l'amplitude des EPPs.

Cependant, qu'en est-il de ces effets lorsque l'activation des nAChRs est saturée par la quantité plus que suffisante d'ACh libérée et que le potentiel d'action postsynaptique est émis? Les contributions glutamatergiques et nitrinergiques parviendront-elles à influencer suffisamment la neurotransmission cholinergique et à causer des échecs de transmission lors de stimulation à de faibles fréquences? Il est concevable que la contribution de la modulation glutamatergique NO-dépendante ait une activité modulatrice non-négligeable lors de phénomènes de plasticité, notamment lors de la dépression synaptique. En effet, lors de stimulations intenses du nerf moteur, l'épuisement des vésicules de réserves provoque une diminution de la libération de l'ACh qui, après une certaine période, variant selon les fréquences utilisées, mène à des échecs dans la capacité de générer des potentiels d'action postsynaptiques. Sous ces conditions, la modulation par le glutamate et le NO parviendrait à moduler de manière significative les propriétés d'excitabilité de la fibre musculaire.

Les effets répertoriés dans cette étude concernent exclusivement les modifications de la transmission synaptique à court terme. Il est probable que le

glutamate et le NO agissent aussi à plus long-terme sur la transmission cholinergique et pourraient très bien agir sur d'autres fonctions cellulaires. Notamment, des études démontrent que l'activation à long terme des mGluRs provoque la modulation de plusieurs gènes (Wang et Mao, 1999; Brackmann et al., 2004). D'autre part, la présence soutenue de NO à la synapse peut aussi induire des modifications d'expression de plus d'une soixantaine de gènes par l'intermédiaire de la production du GMPc (Pilz et Broderick, 2005).

### **3.3.1 POURQUOI L'EFFET DU GLUTAMATE PASSE-T-IL PAR LA PRODUCTION DU NO?**

Les résultats présentés dans cette thèse indiquent que le NO et le glutamate sont produits et libérés à la JNM et participent à la dépression synaptique. De plus, cette thèse démontre que la production du NO est dépendante de l'activation des mGluRs et donc que la modulation nitrinergique dépend de l'activité glutamatergique. Pour quelles raisons la modulation glutamatergique doit-elle absolument passer par la production de NO afin d'affecter la transmission synaptique? Quels avantages y a-t-il à ce que l'action du glutamate sur la transmission synaptique soit indirecte? À cette question, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées.

Une première possibilité : l'activation des récepteurs mGluRs permet une divergence des effets. Comme discuté à la section précédente, bien qu'uniquement les effets synaptiques du glutamate ont été étudiés dans cette thèse cela ne veut pas pour autant dire que l'activation des mGluRs a comme seule but l'activation de la NOS. Leur activation pourrait modifier plusieurs voies cellulaires divergentes dont les effets à plus ou moins long terme affecteraient de différentes façons la physiologie neuromusculaire. Comme le glutamate est libéré à la synapse en condition de stimulation plus intense, l'activation des mGluRs pourrait permettre de synchroniser plusieurs phénomènes, notamment l'expression génique, avec l'intensité de l'activité synaptique.

Deuxièmement, la présence des transporteurs au glutamate à la synapse limite de beaucoup la diffusion du glutamate vers les cellules voisines. Le passage obligé de l'effet du glutamate par la production du NO élargie son domaine d'action aux cellules avoisinantes. Ainsi, le NO produit par une fibre musculaire pourrait théoriquement affecter les terminaisons présynaptiques innervant les JNM voisines.

Troisièmement, le NO, en plus de jouer un rôle dans la modulation de l'activité synaptique, possède une action vasodilatatrice très puissante. Dans les conditions d'activités neuromotrices intenses, la production de NO pourrait causer la vasodilatation des vaisseaux sanguins permettant un soutien métabolique adéquat.

En conclusion, la divergence d'effets des mGluRs et les nombreuses cibles du NO ainsi que son étendue d'action permettent à ce mode de régulation des avenues aussi multiples que diversifiées tant à court qu'à plus long terme.

### **3.4 LA FIBRE MUSCULAIRE COMME PARTENAIRE ACTIF À LA JNM**

La littérature abonde en démonstrations de la contribution des neurones postsynaptiques dans la modulation de la transmission synaptique. À la JNM, bien que l'élément postsynaptique ne soit pas neuronal mais constitué des fibres musculaires, ne change en rien cette caractéristique. Les résultats obtenus dans cette thèse démontrent que les fibres musculaires participent activement à la plasticité synaptique par l'intermédiaire, notamment, des récepteurs mGluRs. En effet, leur présence et locus d'expression ont été confirmés en électrophysiologie, en imagerie et en immunohistochimie. L'identification de la ou des classes de mGluRs impliqués dans l'effet à l'étude n'a cependant pas été possible probablement dû à la plus faible spécificité des antagonistes et anticorps utilisés pour la JNM d'amphibien. L'identification des récepteurs jouant un rôle dans le phénomène à l'étude nous aurait permis de limiter l'étendue des mécanismes

potentiellement mis en œuvre dans la modulation par le glutamate et le NO. De la littérature nous pouvons toutefois émettre des hypothèses quant aux mécanismes d'action impliqués. Connaissant la dépendance au calcium de l'effet observé, nous pouvons en déduire que le calcium provient soit du milieu extracellulaire et pénètre dans le sarcoplasme par des canaux calciques localisé sur la membrane plasmique (Vijayaraghavan et al., 1992; Rathouz et Berg, 1994) ou des réserves calciques intracellulaires. En effet, des études démontrent que des élévations calciques indépendantes de la contraction musculaire pourraient être responsables de la dépression synaptique à la JNM (Cash et al., 1996; Etherington et Everett, 2004).

Le réticulum sarcoplasmique constitue la réserve calcique intracellulaire la plus importante de la fibre musculaire. La sortie des ions calciques de cette réserve est sous le contrôle des récepteurs sensibles à la ryanodine (RyR). L'activation des RyR se fait généralement suite à l'arrivée du potentiel d'action qui induit un changement de configuration des canaux calciques voltage-dépendants, lesquels, par adossement aux RyR, induisant leur ouverture et la sortie de calcium (voir section 1.3.2). Ceci permet des élévations massives de calcium nécessaire aux mécanismes impliqués dans la contraction musculaire. Dans la présente étude, l'émission du potentiel d'action est toutefois bloquée aux fins d'enregistrements mais l'effet synaptique est toutefois observable. Ceci suggère donc qu'un mécanisme différent est mis en œuvre afin de fournir le calcium nécessaire à l'activation de NOS et la conséquente dépression synaptique. De plus, une étude menée à la JNM de grenouille démontre que le calcium impliqué dans la contraction musculaire n'est pas responsable de la dépression synaptique observée lors de stimulation de la JNM (Etherington et Everett, 2004). Il n'en demeure pas moins que les RyRs peuvent être activés indépendamment du potentiel d'action musculaire. En effet, il a été démontré que Homer, une protéine de liaison aux mGluRs colocalise avec les récepteurs RyR1, isoforme prédominante à la JNM, et que la liaison de Homer avec les RyRs stimulerait la sortie de calcium du réticulum (Ward et al., 2004). Ceci suggère que l'activation des mGluRs pourrait permettre

une augmentation localisée de calcium aux abords de la NOS, permettant son activation et la subséquente production de NO.

La seconde hypothèse serait que la source du calcium est extracellulaire. Bien que la caractérisation de la classe de mGluRs présent à la JNM n'ait pas porté fruit dans cette étude, il est justifié de proposer que leur activation puisse mener à l'activation de canaux calciques. En effet, certaines classes de mGluRs permettent l'activation de canaux calciques (Rothe et al., 1994). Ainsi, l'activation des mGluRs pourrait théoriquement permettre l'entrée de calcium dans la fibre musculaire fournissant le substrat nécessaire à l'activation de la NOS et la production de NO. La dépendance à la fréquence de l'effet du glutamate pourrait dans ce cas s'expliquer par les trop faibles augmentations causées par des stimulations de basses fréquences. Les stimulations plus intenses permettraient une accumulation de calcium menant à la production de NO et l'effet sur la dépression synaptique. Des études sur la JNM de grenouille démontrent toutefois que la dépression synaptique à long terme observée lors de stimulations soutenues à basses fréquences (1Hz) n'implique pas les réserves calciques intracellulaires. En effet, Etherington et Everett (2004) démontrent que la dépression synaptique NO-dépendante n'est pas affectée par un bloqueur de la libération de calcium dépendante réticulum sarcoplasmique. Des études seraient donc nécessaires afin de déterminer la ou les sources de calcium impliquée(s) dans l'activation glutamate-dépendante de NOS. Ainsi, la fibre musculaire participe activement à la modulation de la transmission synaptique.

La fibre musculaire participe non seulement à la modulation de la neurotransmission musculaire mais joue un rôle essentiel dans un bon nombre d'autres fonctions essentielles au maintien de la physiologie neuromusculaire. En effet, la fibre musculaire participe activement à la formation, la maturation et le fonctionnement de la JNM. De nombreuses protéines, spécifiques ou non à la JNM, ont été identifiées et leur fonctions dévoilées. Les protéines postsynaptiques sont notamment essentielles à l'élimination des synapses au cours du développement, à

la stabilité des récepteurs nicotiniques et au maintien de la stabilité de l'appareil postsynaptique (Lai et Ip, 2003).

### **3.5 PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LA JNM**

L'une des caractéristiques importantes de la JNM est sa capacité à s'adapter aux modifications de son activité. En effet, l'efficacité de la transmission synaptique peut être modifiée selon les conditions de stimulation ainsi que par des manipulations des niveaux de calcium dans le milieu extracellulaire. Ces modifications peuvent, selon les conditions, augmenter ou réduire la réponse postsynaptique pour des périodes de plus ou moins longues durées.

#### **3.5.1 PLASTICITÉ À COURT TERME**

La dépression synaptique, comme mentionné précédemment, est de manière simplifiée le résultat d'un épuisement du nombre de vésicules synaptiques disponibles résultant en une diminution de l'amplitude des événements postsynaptiques. De manière générale, la stimulation à de hautes fréquences de la terminaison motoneuronale induit la dépression synaptique. Cette dépression étant, comme démontré dans cette thèse, modifiable par le glutamate et le NO. Sous certaines conditions particulières, il arrive que l'amplitude des potentiels de plaque motrice augmente suite à la stimulation. Cette particularité est notamment observable lors de la stimulation pairée et suite à un épisode de dépression synaptique, c'est ce que l'on nomme la potentialisation post-tétanique. À la JNM, la dépression domine cependant la potentialisation.

Il existe cependant plusieurs évidences démontrant la mise en œuvre coïncidente et simultanée de mécanismes potentialisateurs. La potentialisation est toutefois masquée par l'importance de la dépression mais peut être dévoilée par des manipulations expérimentales. La diminution du calcium extracellulaire, diminuant

la probabilité de libération de neurotransmetteurs, en est un exemple. Par ailleurs, la photolyse de calcium dans les CSPs induit elle aussi une augmentation de la libération de neurotransmetteurs mettant à jour une contribution potentialisatrice gliale (Castonguay et Robitaille, 2001). Sous ces conditions particulières, il est fréquent d'observer de la potentialisation synaptique. Des études menées par Pappas et Robitaille (1995) démontrent une implication des prostaglandines comme messenger responsable de la potentialisation à la JNM. Les résultats obtenus dans cette thèse, nous permettent d'aller plus loin et de proposer que la potentialisation serait dépendante de la production musculaire des prostaglandines par l'intermédiaire d'un mécanisme calcium-dépendant. En effet, lors de l'investigation des mécanismes postsynaptiques impliqués dans la composante glutamatergique nitrinergique-dépendante de la dépression synaptique, nous avons mis à jour une composante potentialisatrice. Cette composante serait produite par la fibre musculaire lors de la stimulation à de hautes fréquences et ce, en parallèle avec le NO. En effet, les résultats démontrent que la chélation du calcium musculaire induit une augmentation de la dépression synaptique. Comme la composante dépressive glutamate-NO dépendante est aussi calcium dépendante, ces résultats suggèrent deux choses : Premièrement, que la composante potentialisatrice domine la composante dépressive. Cette affirmation semble toutefois contradictoire avec les résultats obtenus en calcium normal et qui démontrent une dominance de la dépression. En effet, la dépression synaptique est généralement observée dans les conditions de stimulation utilisées dans cette étude. Deuxièmement, ces résultats peuvent également s'expliquer en considérant que la composante potentialisatrice nécessite des niveaux de calcium plus élevés que la composante dépressive glutamatergique NO-dépendante afin de s'exprimer. La chélation incomplète de calcium dans la fibre musculaire suivant l'iontophorèse pourrait mener à une inhibition plus importante de la composante potentialisatrice que de la composante dépressive. Le résultat serait conséquemment une augmentation de dépression synaptique. L'iontophorèse de différentes concentrations de BAPTA dans la fibre musculaire aurait permis de valider cette hypothèse.

### **3.5.2 LA PLASTICITÉ À LONG TERME**

Le paragraphe précédent discute de la plasticité synaptique à court terme à la JNM et l'implication du glutamate et du NO dans l'output synaptique final résultant d'une stimulation induisant la plasticité. La plasticité synaptique à long terme, comme décrite à la section 1.6.1 et 1.6.2, s'exprime, pour sa part, sur une période allant de plusieurs minutes à plusieurs heures. À la JNM d'amphibien, il a été démontré qu'une stimulation de longue durée à basse fréquence induit une dépression de la libération de neurotransmetteurs qui perdure et qui impliquerait le NO (Etherington et Everett, 2004). Il semble donc que le NO aurait aussi un effet de longue durée qui persisterait au-delà de l'arrêt de la stimulation et qui serait causé par une déphosphorylation de NOS par la calcineurine (Etherington et Everett, 2004). La calcineurine sensible au calcium serait activée par l'augmentation des niveaux de calcium dans la fibre musculaire par l'intermédiaire des nAChR (Vernino et al., 1994) ou des canaux calciques voltage-dépendants (Vijayaraghavan et al., 1992; Rathouz et Berg, 1994). Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec les résultats décrits dans cette thèse. En effet, l'application pour une durée de 5 minutes de glutamate induit une diminution de l'amplitude des événements postsynaptiques enregistrés qui persiste suite au retrait du glutamate du milieu d'enregistrement. Compte tenu que certains mGluRs sont couplés positivement aux canaux calciques (Rothe et al., 1994), leur activation pourrait fournir le calcium nécessaire à l'activation de la NOS, et l'activation parallèle de la calcineurine. Ceci mènerait conséquemment à une production continue de NO et expliquerait l'effet prolongé du glutamate sur la transmission synaptique. Bien qu'attrayante, aucune donnée ne démontrent toutefois directement cette hypothèse.

### **3.6 LA CONTRIBUTION DES CELLULES GLIALES**

La synapse, tant centrale que périphérique, n'est plus uniquement considérée comme le lieu de transit de l'information entre les neurones pré et post-synaptique



mais inclus désormais un troisième joueur; la cellule gliale. En effet, les efforts de recherche des dernières années ont permis de mettre à jour le rôle actif des cellules gliales dans la modulation de la transmission synaptique. L'association intime des cellules gliales périssynaptiques à la synapse leur confère un avantage anatomique leur permettant de réguler les fonctions synaptiques. Les cellules gliales possèdent, non seulement cet avantage mais elles sont aussi capables de détecter la présence de neurotransmetteurs et d'être activées par ces derniers via la présence de récepteurs à leur surface. Finalement, elles possèdent aussi la capacité d'induire en retour des réponses permettant de modifier la transmission synaptique.

### **3.6.1 LE RÔLE DES CELLULES GLIALES DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL**

La modulation des propriétés synaptiques par les astrocytes du SNC a reçu beaucoup d'attention dans les dernières années, si bien que de nombreux mécanismes impliqués dans ce mode de communication bidirectionnel ont été mis à jour. Les astrocytes détectent l'activité synaptique et y répondent par des élévations calciques observables dans le cytoplasme entier de l'astrocyte ou de manière plus focale, affectant seulement des prolongements astrocytaires, comme c'est le cas notamment avec les cellules de Bergmann (Grosche et al., 1999; Grosche et al., 2002).

Suite à leur activation, les cellules gliales modulent à leur tour la transmission synaptique (Bezzi et al., 1998; Araque et al., 2000; Pasti et al., 2001) par deux mécanismes différents. Premièrement, par la libération de gliotransmetteurs, notamment de glutamate et de D-sérine, agissant directement sur le neurone postsynaptique ou en modifiant la libération de neurotransmetteurs par la terminaison présynaptique (Bergles et Jahr, 1998; Engelman et MacDermott, 2004). Au niveau de l'hippocampe, des évidences démontrent que la libération de glutamate par les astrocytes se fait de manière vésiculaire et la présence de vésicules contenant le transporteur VGLUT ont été identifiées (Bezzi et al., 2004; Montana et al., 2004).

Deuxièmement, les cellules gliales activées peuvent influencer la synapse en contrôlant la recapture de neurotransmetteur en régulant l'activité de leur transporteurs membranaires (Bergles et Jahr, 1998). Il a été adroitement démontré que le passage d'une vague calcique aux abords d'une synapse modifie les propriétés synaptiques de cette dernière (Newman et Zahs, 1998). Cette observation suggère que la communication entre les cellules gliales permettrait de modifier l'activité d'un groupe de neurones distants et de les maintenir dans un état d'activité semblable (Fellin et Carmignoto, 2004). On parle maintenant d'îlot synaptique fonctionnel dans lequel les synapses confinées au territoire d'un astrocyte sont régulées par le gliotransmetteur libéré par l'astrocyte qui les gouverne (Halassa et al., 2007).

### **3.6.2 RÔLE DES CELLULES DE SCHWANN PÉRISYNAPTiques À LA JNM**

Les cellules de Schwann périssynaptiques (CSPs) se retrouvent en moyenne au nombre de 3 et sont en très étroite relation avec la synapse neuromusculaire. Tout comme les cellules gliales du SNC, les CSPs répondent à l'activité synaptique par des élévations calciques. En effet, la stimulation électrique du nerf moteur (Jahromi et al., 1992) ou l'application d'agonistes parviennent à induire des réponses calciques facilement observables en imagerie calcique. Les CSPs présentes à la JNM de grenouille possèdent à leur surface des récepteurs muscariniques, purinergiques (A1, P2X, P2Y) ainsi que des récepteurs NK-1 à la substance P (Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Bourque et Robitaille, 1998) lesquels sont capables d'induire des élévations calciques lorsqu'activés. Ces réponses calciques induisent à leur tour une augmentation de la libération de neurotransmetteurs par la terminaison présynaptique (Castonguay et Robitaille, 2001). Non seulement les CSPs répondent à la libération présynaptique de neurotransmetteurs par des élévations calciques, mais y répondent par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G. Cette voie de signalisation induit pour sa part une diminution de la libération de neurotransmetteurs (Robitaille, 1998). Ainsi, les cellules gliales sont

capables de moduler à la hausse et à la baisse la libération de neurotransmetteurs. On ne connaît toutefois pas à l'heure actuelle les mécanismes ou les effecteurs impliqués dans cette modulation.

### **3.6.3 MODULATEURS GLIAUX POTENTIELS**

Les données accumulées par le laboratoire au cours des dernières années ont permis d'identifier des messagers, potentiellement gliaux, ayant comme propriété d'augmenter ou diminuer la libération de neurotransmetteurs. Ces messagers potentiels sont le glutamate, le NO et les prostaglandines.

#### **3.6.3.1 MODULATEUR GLIAUX DÉPRESSEURS**

##### **3.6.3.1.1 Le glutamate**

Dans le SNC le glutamate est libéré de manière vésiculaire par les astrocytes. Depuis la démonstration de la participation du glutamate dans la modulation de la transmission synaptique, sa source de production est restée ambiguë. Les CSPs constituent un réservoir attrayant pour la libération de glutamate notamment dû à la présence de transporteur pour ce dernier sur leur membrane plasmique. La démonstration directe d'une source gliale du glutamate à la JNM n'a cependant pas été possible dans cette thèse. Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que la terminaison présynaptique constitue aussi une source potentielle de glutamate. Des expériences d'immunohistochimie à l'aide d'anticorps contre la protéine de transport vésiculaire au glutamate (VGLUT) permettraient de déterminer le ou les compartiments synaptiques impliqués dans la libération de glutamate.

### 3.6.3.1.2 L'oxyde nitrique

Le NO, par sa nature instable et diffusible est difficile à traquer si bien que l'étude de ces effets et de sa source de production passe généralement par l'étude de son enzyme de production la NOS. Les données provenant de plusieurs sources, notamment celles du laboratoire démontrent la présence de la NOS non seulement dans la fibre musculaire (Kusner et Kaminski, 1996) mais aussi dans le compartiment glial (Descarries et al., 1998). Les résultats obtenus dans cette thèse soutiennent que le NO produit suite à la stimulation des mGluRs provient de l'activation de la NOS musculaire. Ce NO, dont l'effet sur la terminaison présynaptique est indépendant de la GC, est le produit de la libération fréquence dépendante de glutamate. Il est toutefois important de noter que le NO est produit de manière indépendante du glutamate. En effet, le glutamate n'est pas libéré de manière tonique lors de stimulation à de basses fréquence ce qui est le cas du NO. En effet, l'étude de Thomas et Robitaille (2001) a démontré que le NO est libéré de manière tonique et diminue la libération de neurotransmetteur via un mécanisme impliquant la GC. Il pourrait ainsi exister deux sources de NO à la JNM, l'une d'origine gliale dont l'effet serait tonique et une source dont l'effet serait dépendant de la fréquence de décharge de la terminaison motoneuronale. On ne peut toutefois pas exclure que les CSPs produisent aussi du NO de manière dépendante de la fréquence mais dont l'action est indépendante du glutamate mais qui viendrait s'ajouter à la contribution de la voie glutamate-NO. Cette alternative pourrait être facilement testée par la chélation du calcium glial, en supposant que la NOS responsable de la production de NO soit dépendante du calcium, ce qui abolirait la contribution gliale à la production totale de NO. Cependant, les expériences du laboratoire démontrent que les élévations calciques gliales sont généralement impliquées dans la potentialisation ce qui ne cadre pas avec l'effet dépresseur associé au NO. Il est toutefois envisageable que des élévations calciques localisées soient responsables de sa production. Toutefois, les données suggèrent davantage la fibre musculaire comme source unique du NO impliqué dans la modulation dépendante de la fréquence de la transmission synaptique.

### **3.6.3.2 MODULATEUR GLIAUX POTENTIALISATEURS**

Castonguay et Robitaille (2001) ont démontré que les élévations calciques dans les CSPs induisent une potentialisation de la transmission synaptique (Castonguay et Robitaille, 2001). D'autre part, Robitaille (1998) a démontré que l'activation des récepteurs couplés aux protéines G induit une dépression synaptique. Paradoxalement, ces mêmes récepteurs, lorsqu'activés par leur agonistes, induisent des réponses calciques lesquelles sont associées à la potentialisation (Castonguay et Robitaille, 2001). La stimulation endogène de ces récepteurs, qui conduit à l'activation de la voie inhibitrice des protéines G ainsi que la genèse de réponses calciques potentialisatrices, résulte en la dépression synaptique. Un équilibre dynamique existerait entre la voie potentialisatrice et inhibitrice; équilibre qui pourrait être déplacé selon les besoins de la synapse.

#### **3.6.3.2.1 Les prostaglandines**

Les prostaglandines constituent la voie présagée de potentialisation à la JNM. En effet, non seulement la phospholipase A2, enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide arachidonique, précurseur des prostaglandines, est présente à la JNM, l'inhibition de leur synthèse à partir de cette dernière induit une diminution de la transmission synaptique. En effet, le blocage de la cyclooxygénase (COX) qui convertie l'acide arachidonique en prostaglandines conduit à une diminution d'amplitude des PPM induite par la stimulation du nerf moteur à basse fréquence. Par ailleurs les inhibiteurs de la COX (aspirine et indométhacin) provoquent une diminution de la dépression synaptique (données préliminaires et Pappas et Robitaille, 1995). De plus, Pappas et collaborateurs (1995) ont démontré par des études quantiques que l'effet des prostaglandines est présynaptique.

Quelques lignes directrices permettent de suggérer une source gliale pour les prostaglandines. En effet, les données d'immunohistochimie démontrent la présence de la PLA2 dans les CSPs (Pappas and Robitaille, 1995). Il est aussi à noter que

l'activité de la COX est dépendante du calcium, si bien que la production des prostaglandines pourrait être sous contrôle des élévations calciques gliales. Afin de démontrer la contribution des cellules gliales dans la potentialisation, les élévations calciques doivent être induites expérimentalement à l'aide du calcium encagé. Ceci permet de passer outre l'activation des récepteurs gliaux couplés à l'activation de la voie des protéines G, laquelle induit de la dépression. Si ces réponses calciques résultant de la photolyse du calcium sont responsables de la libération des prostaglandines alors la photolyse de calcium devrait être sans effet sur la transmission synaptique en présence d'un inhibiteur de la COX. Ces données permettraient de déterminer la source et la nature de la composante potentialisatrice à la JNM.

#### **3.6.4 MODULATION GLIALE DE LA PLASTICITÉ À LA JNM**

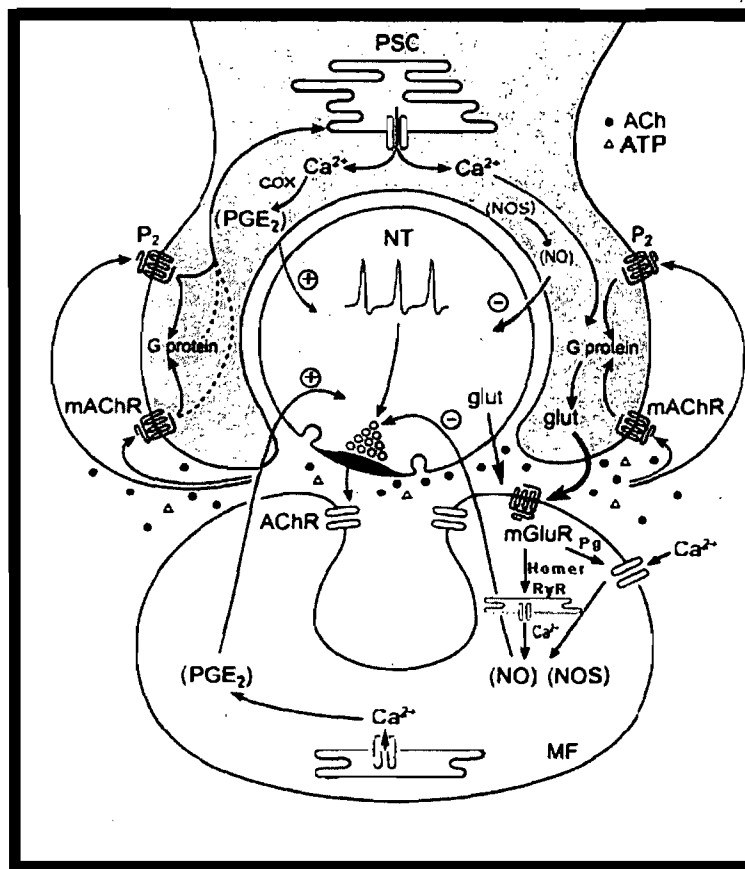
L'implication du NO et du glutamate sur la modulation de la plasticité synaptique et le rôle potentiel des cellules gliales dans leur production nous amène à nous interroger sur la contribution des cellules gliales à la plasticité à la JNM. L'un des apports importants des CSPs à la synapse est leur participation dans la recapture du glutamate et l'importance de cette recapture sur l'expression de la dépression. De plus, comme mentionné précédemment, les prostaglandines, potentiellement d'origine gliale, sont pressenties comme médiatrices de la potentialisation et pourraient donc participer à la plasticité au même titre que le NO. À la lumière de ces connaissances nous pouvons désormais affirmer que les CSPs sont largement outillées pour affecter la plasticité synaptique et affiner son expression bien que les mécanismes précis demeurent encore pour la plupart dissimulés. Notamment, l'identification de la source du glutamate et des prostaglandines permettrait d'attitrer leurs effets sur la plasticité et la transmission synaptique au compartiment glial, si les CSPs sont en effet le locus de leur production.

### **3.7      MODÈLE REVISITÉ DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE À LA JNM DE GRENOUILLE**

La neurotransmission musculaire est généralement considérée comme une synapse simple où la libération de neurotransmetteurs par la terminaison motoneuronale est homogène et stéréotypée. Cependant, les dernières années se sont montrées fertiles en démonstrations de la complexité grandissante des mécanismes mis en œuvre dans sa modulation, sa génétique et sa régulation. En effet, depuis les descriptions pionnières de Katz dans les années 1950, plusieurs éléments modernes sont venus se greffer au concept de synapse purement cholinergique. Par ailleurs, il est désormais non seulement reconnu que l'ATP est colibérée à la JNM, le glutamate, le neurotransmetteur excitateur par excellence du CNS aurait aussi son mot à dire dans la communication motoneuronale au même titre que le NO et les prostaglandines.

Le schéma présenté ci-contre représente une version revisitée et actualisée de la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire d'amphibien avec un accent mis sur les éléments nouveaux apportés par cette thèse.

**Figure 8** Résumé de la transmission neuromusculaire



**Figure 8** : Modifié de Pinard and Robitaille (2008)

### 3.7.1 STIMULATIONS À HAUTES FRÉQUENCES DE LA JNM

-Suite à une stimulation à haute fréquence du nerf moteur, l'ACh et l'ATP sont libérées dans la fente synaptique. L'ACh active les récepteurs musculaires de type nicotiniques. Si la quantité d'ACh libérée est suffisante, la dépolarisation va atteindre le seuil d'émission du potentiel d'action provoquant une dépolarisation soutenue. Cette dépolarisation se propage par la suite dans l'antre des fibres musculaires via le réseau de tubules T permettant la sortie de calcium des réserves du réticulum sarcoplasmique. Cette élévation calcique permet la mise en œuvre des mécanismes impliqués dans la contraction musculaire. De plus, la stimulation à



haute fréquence induit les mécanismes, principalement présynaptiques, impliqués dans la dépression synaptique à court terme, notamment l'épuisement des vésicules de réserve.

-En parallèle, une portion de l'ACh et de l'ATP active respectivement les récepteurs muscariniques et purinergiques sur les CSPs avoisinantes. L'activation de ces derniers provoque non seulement l'activation de la voie des protéines G mais induit par le fait même une élévation calcique. Les mécanismes gliaux ainsi mis en branle induiraient la libération du glutamate et/ou des prostaglandines. Les prostaglandines diffuseraient alors vers la terminaison présynaptique d'où ils affecteraient la transmission synaptique. Pour sa part, le glutamate libéré, de manière vésiculaire ou non, agirait sur les récepteurs musculaires de type mGluRs. L'activation de ces récepteurs induit la stimulation de la production de NO par la nNOS via un mécanisme impliquant le calcium.

-Étant donné que l'origine du glutamate n'est pas déterminée, il ne faut pas négliger la possibilité d'une origine présynaptique du glutamate. Dans ce cas, la stimulation permettrait la libération du glutamate accumulé dans la terminaison présynaptique. Suite à sa libération, le glutamate activerait ses mGluRs musculaires induisant la stimulation de la production de NO. Il est aussi à noter que l'origine du glutamate peut aussi être multiple et provenir des deux compartiments.

-L'origine du calcium impliqué dans l'activation musculaire de la NOS par les mGluRs peut aussi être multiple. En effet, soit il fait partie du calcium impliqué dans la contraction musculaire, bien que les évidences semblent démontrer le contraire, soit il provient d'élévations calciques locales. Ces élévations locales seraient le résultat de l'ouverture de canaux calciques localisés à la surface des fibres musculaire et recrutés suite à l'activation de mGluRs. Elles pourraient aussi être le résultat de l'activation de récepteurs RyR suite à la transduction de l'activation des mGluRs via Homer.

-L'élévation calcique permet l'activation de la nNOS et la production de NO qui diffuse notamment à la terminaison présynaptique où il affecte à la baisse la libération de neurotransmetteur via un mécanisme indépendant de la GC. L'une des hypothèses serait que le NO affecte la transmission synaptique en agissant sur l'endocytose des vésicules freinant ainsi la relâche d'ACh.

-En parallèle de l'activation de mGluRs, les transporteurs gliaux au glutamate (GLAST) font la recapture du glutamate limitant l'accumulation de glutamate dans la fente synaptique.

### 3.7.2 STIMULATION À BASSES FRÉQUENCES DE LA JNM

La description faite précédemment concerne les événements mis en branle lors de stimulations soutenues à des fréquences élevées de la synapse. Certaines différences majeures existent cependant lorsque celle-ci est stimulée à une fréquence faible et ne provoquant pas de plasticité.

1) La dépendance de l'effet du glutamate à la fréquence de stimulation peut être expliquée en considérant premièrement la **cellule gliale comme source de glutamate**.

i) Dans ces conditions de stimulation, la quantité trop faible d'ACh et l'ATP ne parvient pas à induire de réponses calciques observables en imagerie. Cette observation suggère que les mécanismes impliqués dans la libération gliale de glutamate ne soient pas suffisamment activés pour permettre sa relâche.

ii) Si toutefois les mécanismes de libération du glutamate sont tout de même mis en branle, la quantité de glutamate libéré n'est peut-être pas suffisante. Dans ce cas trop peu de mGluRs seront activés pour permettre la production musculaire de NO ou suffisamment de NO pour qu'un effet soit observable sur la synapse.

2) La dépendance de l'effet du glutamate à la fréquence de stimulation peut être expliquée en considérant deuxièmement la **terminaison présynaptique comme source de glutamate**.

i) En posant l'hypothèse que le glutamate se concentre dans les vésicules à corps dense, la stimulation à basse fréquence ne permettrait pas leur recrutement et donc le glutamate ne serait pas libéré.

ii) En posant l'hypothèse que le glutamate est colocalisé avec l'ACh dans les vésicules synaptiques, mais en plus faible concentration, la libération d'une quantité restreinte de vésicules lors de la stimulation à 0.2 Hz ne permettrait encore une fois qu'une activation trop faible des mGluRs pour permettre une activation suffisante de NOS.

Finalement, une différence majeure existe dans les cibles du NO en fonction de la fréquence de stimulation. En effet, contrairement au glutamate, le NO est produit de manière tonique et les cibles de ce NO sont celles du GMPc. En effet, le NO produit de manière tonique agit sur la GC présynaptique afin de diminuer la transmission synaptique. Pour sa part, le NO produit lors de stimulations plus intenses a aussi comme cible la terminaison présynaptique mais n'affecterait pas la GC. Le NO produirait plutôt des modifications post-traductionnelles de protéines synaptiques impliquées dans le complexe SNAP/ NSF menant à une régulation du cycle d'exocytose-endocytose (Meffert et al., 1994; Meffert et al., 1996).

Ce schéma plus complet des mécanismes présynaptiques, gliaux et musculaires impliqués dans la transmission synaptique et sa régulation permet d'entrevoir le nombre incroyable de possibilités de modulation permettant un contrôle fin de la synapse adapté à ses besoins.

## 4 PERSPECTIVES FUTURES ET CONCLUSIONS

### 4.1 PERSPECTIVES FUTURES

Dans cette thèse nous avons démontré la contribution du glutamate et de l'oxyde nitrique dans la modulation de la dépression synaptique à la JNM de grenouilles *rana pipiens*. Les mécanismes postsynaptiques impliqués dans cette plasticité ont aussi été investigués et l'importance de la cellule musculaire dans la communication synaptique a été mise en évidence. Finalement, bien que la contribution des cellules gliales dans la modulation de la transmission synaptique, n'ait pas été démontrée directement, plusieurs observations suggèrent toutefois leur implication. À la base des informations récoltées dans cette thèse, le modèle classique de la transmission à la JNM a été actualisé en y ajoutant la contribution du glutamate et du NO. Ce modèle comporte cependant certains éléments inconnus qui gagneraient à être étudiés. Notamment;

**1) Quelle est la source du glutamate à la JNM?** Afin de vérifier l'origine du glutamate à la JNM, l'injection des CSPs avec un inhibiteur des protéines G permettrait d'inhiber spécifiquement les protéines G (Robitaille, 1998). Dans ce cas, si l'origine du glutamate est gliale alors l'effet du MCPG sur la dépression synaptique sera aboli par l'inhibition des CSPs. Toutefois, si l'origine du glutamate est présynaptique, l'effet de l'inhibition des CSPs n'affecterait pas l'effet du MCPG sur la dépression synaptique

- Si la source du glutamate est gliale:

*-Il serait premièrement intéressant de déterminer d'abords quels sont les récepteurs et les mécanismes gliaux impliqués dans la stimulation de sa libération.* Les cellules gliales possèdent des récepteurs muscariniques et purinergiques dont l'activation produit des élévations calciques ainsi que l'activation des protéines G auxquelles ils

sont associés. L'utilisation d'agonistes spécifiques permettrait de déterminer si leur activation permet la libération de glutamate à la JNM.

*Le glutamate est-il libéré de manière calcium-dépendante?* La libération de glutamate dans les astrocytes se fait de manière calcium-dépendante. À la JNM si la libération de glutamate par les CSPs se fait aussi de manière dépendante du calcium alors l'injection de BAPTA dans les CSPs devrait mener à la perte totale de l'effet du MCPG sur la dépression synaptique.

*-Le glutamate est-il libéré de manière vésiculaire?* L'utilisation de marqueurs pour les transporteurs vésiculaires en immunohistochimie pourrait premièrement nous informer de la présence de l'accumulation de glutamate dans le compartiment glial. Deuxièmement, l'aspect fonctionnel de ce transporteur vésiculaire pourrait être étudié à l'aide d'un inhibiteur des transporteurs vésiculaires (chicago sky blue 6B). L'inhibition du transporteur devrait résulter en la perte de l'effet du MCPG sur la dépression synaptique si la libération de glutamate se fait de manière vésiculaire.

- Si la source est présynaptique :

*-Le glutamate est-il colocalisé dans les mêmes vésicules que l'ACh ou possède-t-il ses propres vésicules.* Les études en immunohistochimie permettraient de déterminer la présence du transporteur vésiculaire dans la terminaison présynaptique.

**2) Comment cette composante dépressive s'incorpore-t-elle avec la composante potentialisatrice et quelles sont les conditions favorisant l'expression de l'une ou de l'autre?** La dépression synaptique est le phénomène de plasticité observé de manière prédominante à la JNM dans les conditions utilisées dans cette étude. Toutefois, il est possible d'observer la potentialisation suivant un protocole de stimulation intense et prolongé (potentialisation post-tétanique) ou par la photolyse de calcium dans les CSPs. Suite à cette dernière observation, il est intéressant de

spéculer que les CSPs soient capables de libérer, non seulement un messager dépresseur (le glutamate) mais aussi un messager potentialisateur. Dans ce cas et selon les conditions et les besoins de la synapse, les CSPs auraient la capacité de contrôler les niveaux de dépression et de potentialisation. L'un des messagers potentialisateurs potentiels serait les prostaglandines. En effet, des données du laboratoire démontrent qu'elles augmentent l'amplitude des EPPs et leur enzyme de synthèse (COX) se trouve dans le compartiment glial. La contribution des CSPs et des prostaglandines serait facilement étudiable à l'aide de la photolyse de calcium. En effet, la photolyse de calcium en présence d'un inhibiteur de la COX devrait abolir l'effet potentialisateur de la photolyse sur la transmission synaptique si la réponse gliale est à l'origine des prostaglandines.

**3) Quelle est la source du NO produit de manière tonique à la JNM, la fibre musculaire ou la CSP?** Des expériences du laboratoire démontrent la présence de l'enzyme NOS dans le compartiment glial (Descarries et al., 1998). Ainsi, il est probable que la fibre musculaire soit responsable de la production de NO lors de stimulations intenses et de longue durée alors que le NO glial soit responsable de la production tonique. La contribution gliale à la production de NO pourrait être testée par l'injection de BAPTA dans les CSPs. Compte tenu de la dépendance de la NOS au calcium, l'injection de BAPTA résulterait en l'arrêt de la production tonique de NO facilement observable à l'aide d'un chélateur de ce dernier. En effet, en conditions normales, l'application d'un chélateur de NO produit une augmentation de la transmission synaptique qui devrait être abolie suite à l'injection de BAPTA dans les CSPs, si la source du NO tonique est gliale.

**4) Quelle est la source de calcium impliquée dans l'activation de la NOS musculaire et par quels moyens l'activation des mGluRs conduit-elle à une élévation calcique?** En se basant sur les données de la littérature, la source la plus probable du calcium impliqué dans l'activation de la NOS par les mGluRs est le calcium provenant des réserves calciques intracellulaires. Si la source du calcium impliqué dans la production du NO est d'origine des réserves intracellulaires suite à

l'activation des récepteurs à la ryanodine, l'ionotophorèse d'un bloqueur des canaux à la ryanodine dans la fibre musculaire, induirait une diminution de la dépression synaptique et abolirait l'effet de l'application de MCPG sur la dépression.

L'investigation des points et questions soulevés ci-contre permettrait d'offrir une vision plus complète des mécanismes impliqués dans la transmission synaptique à la JNM. De plus, la contribution des cellules gliales et de la fibre musculaire à la plasticité synaptique ainsi que les effecteurs de cette plasticité (glutamate, NO et prostaglandines) pourraient être mis à jour. Finalement, l'étude des modes de recrutement des cellules gliales en conditions physiologiques permettrait de déterminer les circonstances permettant leur activation.

## 4.2 CONCLUSIONS

La jonction neuromusculaire d'amphibien, relativement simple comparativement aux synapses centrales, démontre tout de même un niveau élevé de complexité, tant au niveau de son anatomie que des mécanismes mis en place pour réguler son activité. Bien que la JNM ait longtemps été considérée comme purement cholinergique, cette thèse démontre que le glutamate et l'oxyde nitrique sont non seulement produits à cette synapse, mais qu'ils participent activement à la transmission synaptique. La présence de transporteurs et de récepteurs au glutamate ne représente pas une nouveauté car la littérature des dernières années fait mention de leur présence à la JNM. Cependant les résultats exposés cette thèse démontrent pour la première fois la fonctionnalité de la modulation glutamatergique et sa participation à la plasticité synaptique. La dépression synaptique étant le phénomène de plasticité synaptique à court terme principal à la JNM, la participation du glutamate et du NO dans sa modulation nous informe de l'importance de ces neuromodulateurs sur la fonction synaptique. La présente thèse permet donc d'actualiser la vision classique de la transmission neuromusculaire.

Non seulement, le glutamate et le NO permettent la régulation de la transmission synaptique, les données récoltées dans cette thèse supportent la notion d'un rôle actif des cellules gliales dans la neurotransmission. En effet, le concept de synapse tripartite émergeant d'élégantes études menées principalement dans le SNC démontrent désormais hors de tous doutes le rôle actif des cellules gliales dans la fonction synaptique. Bien que plusieurs aspects du fonctionnement des interactions synapse-glie demeurent obscurs, leur importance dans la physiologie nerveuse n'est plus à démontrer. Les données récoltées par le laboratoire au fil des années, additionnées des données provenant de la littérature, démontrent la contribution des cellules de Schwann pérисynaptiques dans la régulation de la transmission synaptique à la JNM. Les CSPs sont sensibles à l'activité synaptique et pourraient y répondre par la libération de substance neuromodulatrices dont le glutamate, le NO et les prostaglandines. La démonstration définitive de leur origine gliale demeure



toutefois à être réalisée avant de leur attribuer définitivement cette fonction. Somme toute, à la lumière des données recueillies au laboratoire dans les dernières années leur implication dans la modulation transmission et la plasticité synaptique est incontestable.

La fibre musculaire, faisant office d'élément postsynaptique à la JNM doit aussi être prise en considération quant au rôle qu'elle a à jouer dans le contrôle de la transmission synaptique. On a longtemps négligé la contribution des cellules gliales à la fonction synaptique, tout comme les fibres musculaires sont fréquemment ignorées comme acteur dans le contrôle de la transmission synaptique. Les données récoltées dans cette thèse suggèrent que les fibres musculaires répondent à l'activité de la terminaison présynaptique par la libération fréquence dépendante de NO. De plus, la présente étude a aussi permis de mettre à jour la présence d'une composante potentialisatrice musculaire participant aussi au contrôle de l'activité synaptique.

Le contrôle adéquat de la contraction musculaire, permettant la genèse de mouvements cohérents, est essentiel à la vie et la survie. La mise en place d'éléments de régulation permettant d'ajuster le transit de l'information au sein des synapses motoneuronales est donc primordial. On ne peut qu'uniquement constater que l'évolution a adroitement su mettre en place de nombreux mécanismes permettant le contrôle fin et adéquat des fonctions de la JNM. Elle a su prendre partie des avantages et caractéristiques des trois éléments formant la JNM et les faire participer activement au maintien de la fonction motrice.

## 5 BIBIOGRAPHIE DE LA THÈSE

- Abbott LF, Varela JA, Sen K, Nelson SB (1997) Synaptic depression and cortical gain control. *Science* 275:220-224.
- Abdul-Ghani MA, Valiante TA, Carlen PL, Pennefather PS (1996) Metabotropic glutamate receptors coupled to IP<sub>3</sub> production mediate inhibition of IAHP in rat dentate granule neurons. *J Neurophysiol* 76:2691-2700.
- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.
- Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB (2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* 25:510-517.
- Akassoglou K (2005) Nerve growth factor-independent neuronal survival: a role for NO donors. *Mol Pharmacol* 68:952-955.
- Amara SG, Fontana AC (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 41:313-318.
- Ambiel CR, Alves-Do-Prado W (1997) Neuromuscular facilitation and blockade induced by L-arginine and nitric oxide in the rat isolated diaphragm. *Gen Pharmacol* 28:789-794.
- Ango F, Prezeau L, Muller T, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Pin JP, Bockaert J, Fagni L (2001) Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* 411:962-965.
- Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18:581-589.
- Anwyl R (1999) Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 29:83-120.
- Aonuma H, Nagayama T, Takahata M (2000) Modulatory effects of nitric oxide on synaptic depression in the crayfish neuromuscular system. *J Exp Biol* 203:3595-3602.
- Aramori I, Nakanishi S (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8:757-765.
- Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD (1995) Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 376:74-80.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998b) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822-6829.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666-673.

- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4155-4160.
- Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem* 268:15329-15332.
- Ashby MC, De La Rue SA, Ralph GS, Uney J, Collingridge GL, Henley JM (2004) Removal of AMPA receptors (AMPA-Rs) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. *J Neurosci* 24:5172-5176.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Auld DS, Colomar A, Belair EL, Castonguay A, Pinard A, Rousse I, Thomas S, Robitaille R (2003) Modulation of neurotransmission by reciprocal synapse-glial interactions at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32:1003-1015.
- Baader SL, Schilling K (1996) Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 16:1440-1449.
- Balcar VJ, Johnston GA (1972) Glutamate uptake by brain slices and its relation to the depolarization of neurones by acidic amino acids. *J Neurobiol* 3:295-301.
- Bannai S (1986) Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J Biol Chem* 261:2256-2263.
- Barbon A, Vallini I, Barlati S (2001) Genomic organization of the human GRIK2 gene and evidence for multiple splicing variants. *Gene* 274:187-197.
- Barker LA, Dowdall MJ, Whittaker VP (1972) Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Stable-bound acetylcholine. *Biochem J* 130:1063-1075.
- Barnes-Davies M, Forsythe ID (1995) Pre- and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slices. *J Physiol* 488 ( Pt 2):387-406.
- Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276:2042-2045.
- Baxter RL, Vega-Riveroll LJ, Deuchars J, Parson SH (2005) A2A adenosine receptors are located on presynaptic motor nerve terminals in the mouse. *Synapse* 57:229-234.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-1437.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1620-1624.
- Bennett MK, Calakos N, Scheller RH (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257:255-259.

- Bennett MR (1983) Development of neuromuscular synapses. *Physiol Rev* 63:915-1048.
- Bennett MR (2000) The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol* 60:109-137.
- Berger UV, Carter RE, Coyle JT (1995) The immunocytochemical localization of N-acetylaspartyl glutamate, its hydrolysing enzyme NAALADase, and the NMDAR-1 receptor at a vertebrate neuromuscular junction. *Neuroscience* 64:847-850.
- Bergles DE, Jahr CE (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7709-7716.
- Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 9:293-298.
- Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13-26.
- Berry CB, Hayes D, Murphy A, Wiessner M, Rauen T, McBean GJ (2005) Differential modulation of the glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. *Brain Res* 1037:123-133.
- Bettler B, Mulle C (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34:123-139.
- Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 5:583-595.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613-620.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Bhardwaj A, Northington FJ, Ichord RN, Hanley DF, Traystman RJ, Koehler RC (1997a) Characterization of ionotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo in rats. *Stroke* 28:850-856; discussion 856-857.
- Bhardwaj A, Northington FJ, Martin LJ, Hanley DF, Traystman RJ, Koehler RC (1997b) Characterization of metabotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:153-160.
- Bicker G (2005) STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. *Bioessays* 27:495-505.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357-374.
- Bliss TV, Douglas RM, Errington ML, Lynch MA (1986) Correlation between long-term potentiation and release of endogenous amino acids from dentate gyrus of anaesthetized rats. *J Physiol* 377:391-408.
- Blond O, Daniel H, Otani S, Jaillard D, Crepel F (1997) Presynaptic and postsynaptic effects of nitric oxide donors at synapses between parallel fibres

- and Purkinje cells: involvement in cerebellar long-term depression. *Neuroscience* 77:945-954.
- Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Moncada S, Mann GE (1992) L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *Biochem J* 284 (Pt 1):15-18.
- Bolshakov VY, Siegelbaum SA (1995) Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* 269:1730-1734.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7162-7166.
- Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417:649-653.
- Borst JG, Sakmann B (1999) Depletion of calcium in the synaptic cleft of a calyx-type synapse in the rat brainstem. *J Physiol* 521 Pt 1:123-133.
- Borst JG, Helmchen F, Sakmann B (1995) Pre- and postsynaptic whole-cell recordings in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Physiol* 489 (Pt 3):825-840.
- Boudin H, Doan A, Xia J, Shigemoto R, Huganir RL, Worley P, Craig AM (2000) Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* 28:485-497.
- Boulland JL, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Freneau RT, Jr., Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol* 480:264-280.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 512 (Pt 1):197-209.
- Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68.
- Bower JM, Haberly LB (1986) Facilitating and nonfacilitating synapses on pyramidal cells: a correlation between physiology and morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1115-1119.
- Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15:453-462.
- Brackmann M, Zhao C, Kuhl D, Manahan-Vaughan D, Braunewell KH (2004) mGluRs regulate the expression of neuronal calcium sensor proteins NCS-1 and VILIP-1 and the immediate early gene *arg3.1/arc* in the hippocampus in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1073-1079.
- Bradley E, Law A, Bell D, Johnson CD (2003) Effects of varying impulse number on cotransmitter contributions to sympathetic vasoconstriction in rat tail artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H2007-2014.

- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:284-288.
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:682-685.
- Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267:10976-10981.
- Brenman JE, Bredt DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 7:374-378.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.
- Brum G, Rios E, Stefani E (1988) Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol* 398:441-473.
- Brune B, Lapetina EG (1991) Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 181:921-926.
- Brune B, Dimmeler S, Molina y Vedia L, Lapetina EG (1994) Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci* 54:61-70.
- Bunge RP (1994) The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J Neurol* 242:S19-21.
- Burnashev N, Villarroel A, Sakmann B (1996) Dimensions and ion selectivity of recombinant AMPA and kainate receptor channels and their dependence on Q/R site residues. *J Physiol* 496 (Pt 1):165-173.
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 485 (Pt 2):403-418.
- Burnstock G (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1:239-248.
- Burnstock G (1990) The fifth Heymans memorial lecture-Ghent, February 17, 1990. Co-transmission. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 304:7-33.
- Burnstock G (2004) Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 4:47-52.
- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 12:671-682.
- Calza L, Giardino L, Pozza M, Micera A, Aloe L (1997) Time-course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone, and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3368-3373.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* 75:889-907.

- Cash S, Dan Y, Poo MM, Zucker R (1996) Postsynaptic elevation of calcium induces persistent depression of developing neuromuscular synapses. *Neuron* 16:745-754.
- Castillo PE, Janz R, Sudhof TC, Tzounopoulos T, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 388:590-593.
- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial  $\text{Ca}^{2+}$  internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1911-1922.
- Ceccarelli B, Hurlbut WP, Mauro A (1973) Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:499-524.
- Chao DS, Hwang PM, Huang F, Bredt DS (1996) Localization of neuronal nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 268:488-496.
- Chavis P, Fagni L, Lansman JB, Bockaert J (1996) Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature* 382:719-722.
- Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:98-106.
- Choi DW (1994) Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res* 100:47-51.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467-27473.
- Chvanov M, Gerasimenko OV, Petersen OH, Tepikin AV (2006) Calcium-dependent release of NO from intracellular S-nitrosothiols. *Embo J* 25:3024-3032.
- Ciruela F, Robbins MJ, Willis AC, McIlhinney RA (1999) Interactions of the C terminus of metabotropic glutamate receptor type 1alpha with rat brain proteins: evidence for a direct interaction with tubulin. *J Neurochem* 72:346-354.
- Collet C, Strube C, Csernoch L, Mallouk N, Ojeda C, Allard B, Jacquemond V (2002) Effects of extracellular ATP on freshly isolated mouse skeletal muscle cells during pre-natal and post-natal development. *Pflugers Arch* 443:771-778.
- Congar P, Leinekugel X, Ben-Ari Y, Crepel V (1997) A long-lasting calcium-activated nonselective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 17:5366-5379.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M (1998) EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex* 8:108-116.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.

- Cousin MA, Robinson PJ (1999) Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J Neurochem* 73:2227-2239.
- Coussen F, Perrais D, Jaskolski F, Sachidhanandam S, Normand E, Bockaert J, Marin P, Mulle C (2005) Co-assembly of two GluR6 kainate receptor splice variants within a functional protein complex. *Neuron* 47:555-566.
- Crepel F, Krupa M (1988) Activation of protein kinase C induces a long-term depression of glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. An in vitro study. *Brain Res* 458:397-401.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183:611-612.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1960) The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol* 150:656-682.
- Daikhin Y, Yudkoff M (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 130:1026S-1031S.
- Dale LB, Bhattacharya M, Seachrist JL, Anborgh PH, Ferguson SS (2001) Agonist-stimulated and tonic internalization of metabotropic glutamate receptor 1a in human embryonic kidney 293 cells: agonist-stimulated endocytosis is beta-arrestin1 isoform-specific. *Mol Pharmacol* 60:1243-1253.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Daniel H, Hemart N, Jaillard D, Crepel F (1992) Coactivation of metabotropic glutamate receptors and of voltage-gated calcium channels induces long-term depression in cerebellar Purkinje cells in vitro. *Exp Brain Res* 90:327-331.
- Daniel H, Hemart N, Jaillard D, Crepel F (1993) Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3':5' cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 5:1079-1082.
- Daniels RW, Collins CA, Chen K, Gelfand MV, Featherstone DE, DiAntonio A (2006) A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron* 49:11-16.
- David P, el Far O, Martin-Mouto N, Poupon MF, Takahashi M, Seagar MJ (1993) Expression of synaptotagmin and syntaxin associated with N-type calcium channels in small cell lung cancer. *FEBS Lett* 326:135-139.
- Davies CH, Clarke VR, Jane DE, Collingridge GL (1995) Pharmacology of postsynaptic metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Br J Pharmacol* 116:1859-1869.
- De Camilli P, Benfenati F, Valtorta F, Greengard P (1990) The synapsins. *Annu Rev Cell Biol* 6:433-460.
- Degtyarenko KN, Archakov AI (1993) Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett* 332:1-8.
- Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci* 18:3606-3619.
- Del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.



- Delgado R, Maureira C, Oliva C, Kidokoro Y, Labarca P (2000) Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, shibire. *Neuron* 28:941-953.
- Demple B (1999) Genetic responses against nitric oxide toxicity. *Braz J Med Biol Res* 32:1417-1427.
- Desaki J, Uehara Y (1981) The overall morphology of neuromuscular junctions as revealed by scanning electron microscopy. *J Neurocytol* 10:101-110.
- Descarries LM, Cai S, Robitaille R, Josephson EM, Morest DK (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* 27:829-840.
- Dhami GK, Ferguson SS (2006) Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther* 111:260-271.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4214-4218.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995-1008.
- Docherty M, Bradford HF, Wu JY (1987) Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. *Nature* 330:64-66.
- Dohlman HG, Thorner J (1997) RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 272:3871-3874.
- Dolphin AC (1995) The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exp Physiol* 80:1-36.
- Donevan SD, Rogawski MA (1995) Intracellular polyamines mediate inward rectification of  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9298-9302.
- Dowdall MJ, Boyne AF, Whittaker VP (1974) Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem J* 140:1-12.
- Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T (2006) The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:235-276.
- Dulhunty AF, Franzini-Armstrong C (1975) The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *J Physiol* 250:513-539.
- Dunah AW, Yasuda RP, Luo J, Wang Y, Prybylowski KL, Wolfe BB (1999) Biochemical studies of the structure and function of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptors. *Mol Neurobiol* 19:151-179.
- Duncan RS, Hwang SY, Koulen P (2005) Effects of Ves1/Homer proteins on intracellular signaling. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:527-535.

- Eccles JC, Sherrington CS (1930) Reflex summation in the ipsilateral spinal flexion reflex. *J Physiol* 69:1-28.
- Eccles JC, O'Connor W J (1941) Abortive impulses at the neuro-muscular junction. *J Physiol* 100:318-328.
- Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511-525.
- Ehrengruber MU, Kato A, Inokuchi K, Hennou S (2004) Homer/Vesl proteins and their roles in CNS neurons. *Mol Neurobiol* 29:213-227.
- Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH (1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3396-3401.
- Eliot LS, Kandel ER, Hawkins RD (1994) Modulation of spontaneous transmitter release during depression and posttetanic potentiation of Aplysia sensory-motor neuron synapses isolated in culture. *J Neurosci* 14:3280-3292.
- Ellis JL, Burnstock G (1990) Neuropeptide Y neuromodulation of sympathetic co-transmission in the guinea-pig vas deferens. *Br J Pharmacol* 100:457-462.
- Engelman HS, MacDermott AB (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci* 5:135-145.
- Erecinska M, Silver IA (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 35:245-296.
- Erecinska M, Zaleska MM, Nissim I, Nelson D, Dagani F, Yudkoff M (1988) Glucose and synaptosomal glutamate metabolism: studies with [ $^{15}\text{N}$ ]glutamate. *J Neurochem* 51:892-902.
- Ervasti JM, Campbell KP (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66:1121-1131.
- Etherington SJ, Everett AW (2004) Postsynaptic production of nitric oxide implicated in long-term depression at the mature amphibian (*Bufo marinus*) neuromuscular junction. *J Physiol* 559:507-517.
- Evans WH, Martin PE (2002) Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19:121-136.
- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23:80-88.
- Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De Camilli P (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* 155:193-200.
- Fatt P, Katz B (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol* 115:320-370.
- Faundez V, Horng JT, Kelly RB (1998) A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* 93:423-432.
- Feil R, Hofmann F, Kleppisch T (2005) Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci* 16:23-41.
- Fellin T, Carmignoto G (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol* 559:3-15.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.

- Fernandez I, Arac D, Ubach J, Gerber SH, Shin O, Gao Y, Anderson RG, Sudhof TC, Rizo J (2001) Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32:1057-1069.
- Ferraguti F, Baldani-Guerra B, Corsi M, Nakanishi S, Corti C (1999) Activation of the extracellular signal-regulated kinase 2 by metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci* 11:2073-2082.
- Ferraro G, Montalbano ME, La Grutta V (1999) Nitric oxide and glutamate interaction in the control of cortical and hippocampal excitability. *Epilepsia* 40:830-836.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2006) Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54:676-690.
- Finch EA, Augustine GJ (1998) Local calcium signalling by inositol-1,4,5-trisphosphate in Purkinje cell dendrites. *Nature* 396:753-756.
- Fisher JM, Sossin W, Newcomb R, Scheller RH (1988) Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell* 54:813-822.
- Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Cuttle MF, Takahashi T (1998) Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron* 20:797-807.
- Francesconi A, Duvoisin RM (2000) Opposing effects of protein kinase C and protein kinase A on metabotropic glutamate receptor signaling: selective desensitization of the inositol trisphosphate/Ca<sup>2+</sup> pathway by phosphorylation of the receptor-G protein-coupling domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6185-6190.
- Freneau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellochio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31:247-260.
- Freneau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14488-14493.
- Fu WM, Liou JC, Lee YH, Liou HC (1995) Potentiation of neurotransmitter release by activation of presynaptic glutamate receptors at developing neuromuscular synapses of *Xenopus*. *J Physiol* 489 (Pt 3):813-823.
- Fu WM, Liou HC, Chen YH, Wang SM (1998) Coexistence of glutamate and acetylcholine in the developing motoneurons. *Chin J Physiol* 41:127-132.
- Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 435:379-387.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601.

- Gage PW (1992) Activation and modulation of neuronal K<sup>+</sup> channels by GABA. *Trends Neurosci* 15:46-51.
- Gallop JL, Butler PJ, McMahon HT (2005) Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission. *Nature* 438:675-678.
- Garbers DL (1992) Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71:1-4.
- Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6448-6453.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392:821-824.
- Garthwaite J (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14:60-67.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.
- Garthwaite J, Southam E, Anderton M (1989) A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J Neurochem* 53:1952-1954.
- Gasparini F, Kuhn R, Pin JP (2002) Allosteric modulators of group I metabotropic glutamate receptors: novel subtype-selective ligands and therapeutic perspectives. *Curr Opin Pharmacol* 2:43-49.
- Gegelashvili G, Schousboe A (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull* 45:233-238.
- Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC, Schousboe A (2000) The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int* 37:163-170.
- Gensert JM, Ratan RR (2006) The metabolic coupling of arginine metabolism to nitric oxide generation by astrocytes. *Antioxid Redox Signal* 8:919-928.
- Gerber U, Gähwiler BH (1994) Modulation of potassium conductances by metabotropic glutamate receptors in the hippocampus. *Ren Physiol Biochem* 17:129-131.
- Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz G (1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* 132:71-74.
- Giniatullin RA, Sokolova EM (1998) ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors. *Br J Pharmacol* 124:839-844.
- Goldstein J, Lopez-Costa JJ, Saavedra JP (1997) Changes in NADPH diaphorase reactivity and neuronal nitric oxide synthase in the rat retina following constant illumination. *Neurosci Lett* 231:45-48.
- Gomes FC, Spohr TC, Martinez R, Moura Neto V (2001) Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Braz J Med Biol Res* 34:611-620.
- Gomez J, Joly C, Kuhn R, Knöpfel T, Bockaert J, Pin JP (1996) The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the

- other intracellular domains to control coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 271:2199-2205.
- Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JR, Singel DJ, Stamler JS (1999) The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9027-9032.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22:5442-5451.
- Greengard P, Benfenati F, Valtorta F (1994) Synapsin I, an actin-binding protein regulating synaptic vesicle traffic in the nerve terminal. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 29:31-45.
- Gregor P, O'Hara BF, Yang X, Uhl GR (1993) Expression and novel subunit isoforms of glutamate receptor genes GluR5 and GluR6. *Neuroreport* 4:1343-1346.
- Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH (1984) The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 308:645-647.
- Grishin S, Shakirzyanova A, Giniatullin A, Afzalov R, Giniatullin R (2005) Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 21:1271-1279.
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 68:138-149.
- Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139-143.
- Grozdanovic Z, Gossrau R (1997) Nitric oxide NMDA signalling in neuromuscular transmission: a missing link in motor end plate diversity and modulation. *Histochem J* 29:267-269.
- Grozdanovic Z, Gossrau R (1998) Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 291:57-63.
- Guengerich FP (1991) Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* 266:10019-10022.
- Gulledge AT, Kampa BM, Stuart GJ (2005) Synaptic integration in dendritic trees. *J Neurobiol* 64:75-90.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 27:6473-6477.
- Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF (1992) The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 8:211-216.
- Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF (1996) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med* 2:1017-1021.
- Hartell NA (1994) cGMP acts within cerebellar Purkinje cells to produce long term depression via mechanisms involving PKC and PKG. *Neuroreport* 5:833-836.

- Hartzell HC, Fischmeister R (1986) Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on  $\text{Ca}^{2+}$  current in single heart cells. *Nature* 323:273-275.
- Hassel B, Sonnewald U (1995) Glial formation of pyruvate and lactate from TCA cycle intermediates: implications for the inactivation of transmitter amino acids? *J Neurochem* 65:2227-2234.
- Hassel B, Brathe A (2000) Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate. *J Neurosci* 20:1342-1347.
- Hassinger TD, Atkinson PB, Strecker GJ, Whalen LR, Dudek FE, Kossel AH, Kater SB (1995) Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *J Neurobiol* 28:159-170.
- Heath PR, Shaw PJ (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26:438-458.
- Hemart N, Daniel H, Jaillard D, Crepel F (1994) Properties of glutamate receptors are modified during long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Res* 19:213-221.
- Hemmings B, Woschitz S, Pitters E, Klosch B, Volker C, Schmidt K, Mayer B (1998) The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN): characterization of its action on pure nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 430:397-400.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21:RC181.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:150-166.
- Heumann R, Villegas J, Herzfeld DW (1981) Acetylcholine synthesis in the Schwann cell and axon in the giant nerve fiber of the squid. *J Neurochem* 36:765-768.
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:315-344.
- Heuss C, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U (1999) G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 2:1070-1077.
- Heynen AJ, Quinlan EM, Bae DC, Bear MF (2000) Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* 28:527-536.
- Hirai H (2001) Modification of AMPA receptor clustering regulates cerebellar synaptic plasticity. *Neurosci Res* 39:261-267.
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J (1996) The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6031-6036.
- Hirokawa N (1993) Axonal transport and the cytoskeleton. *Curr Opin Neurobiol* 3:724-731.

- Hokfelt T (1991) Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron* 7:867-879.
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991)  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2811-2814.
- Hosaka M, Hammer RE, Sudhof TC (1999) A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* 24:377-387.
- Huang Y, Man HY, Sekine-Aizawa Y, Han Y, Juluri K, Luo H, Cheah J, Lowenstein C, Haganir RL, Snyder SH (2005) S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Neuron* 46:533-540.
- Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14:346-352.
- Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265:1883-1885.
- Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA (1996) Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:981-987.
- Hugon J, Vallat JM, Dumas M (1996) [Role of glutamate and excitotoxicity in neurologic diseases]. *Rev Neurol (Paris)* 152:239-248.
- Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G, Bohme E (1990) Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* 190:273-278.
- Iino M (1999) Molecular aspects of the excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Jpn J Physiol* 49:325-333.
- Innocenti B, Parpura V, Haydon PG (2000) Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci* 20:1800-1808.
- Isaacson JS (1998) GABAB receptor-mediated modulation of presynaptic currents and excitatory transmission at a fast central synapse. *J Neurophysiol* 80:1571-1576.
- Isshiki M, Ando J, Korenaga R, Kogo H, Fujimoto T, Fujita T, Kamiya A (1998) Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5009-5014.
- Ito M (1984) The modifiable neuronal network of the cerebellum. *Jpn J Physiol* 34:781-792.
- Ito M, Sakurai M, Tongroach P (1982) Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 324:113-134.

- Jackson M, Song W, Liu MY, Jin L, Dykes-Hoberg M, Lin CI, Bowers WJ, Federoff HJ, Sternweis PC, Rothstein JD (2001) Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* 410:89-93.
- Jacoby S, Sims RE, Hartell NA (2001) Nitric oxide is required for the induction and heterosynaptic spread of long-term potentiation in rat cerebellar slices. *J Physiol* 535:825-839.
- Jaffrey SR, Snyder SH (1996) PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* 274:774-777.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
- Jahr CE, Stevens CF (1990a) A quantitative description of NMDA receptor-channel kinetic behavior. *J Neurosci* 10:1830-1837.
- Jahr CE, Stevens CF (1990b) Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics. *J Neurosci* 10:3178-3182.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.
- Jaskolski F, Coussen F, Mulle C (2005) Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26:20-26.
- Jaskolski F, Coussen F, Nagarajan N, Normand E, Rosenmund C, Mulle C (2004) Subunit composition and alternative splicing regulate membrane delivery of kainate receptors. *J Neurosci* 24:2506-2515.
- Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K (2003) Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr Opin Neurobiol* 13:271-278.
- Jo YH, Role LW (2002) Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci* 22:4794-4804.
- Kamiya H, Zucker RS (1994) Residual  $\text{Ca}^{2+}$  and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371:603-606.
- Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H (2002) Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol* 444:39-62.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.
- Kang YC, Kim PK, Choi BM, Chung HT, Ha KS, Kwon YG, Kim YM (2004) Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide. *In Vivo* 18:367-376.
- Kanner BI, Borre L (2002) The dual-function glutamate transporters: structure and molecular characterisation of the substrate-binding sites. *Biochim Biophys Acta* 1555:92-95.
- Kanner BI, Kavanaugh MP, Bendahan A (2001) Molecular characterization of substrate-binding sites in the glutamate transporter family. *Biochem Soc Trans* 29:707-710.
- Kantor DB, Lanzrein M, Stary SJ, Sandoval GM, Smith WB, Sullivan BM, Davidson N, Schuman EM (1996) A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. *Science* 274:1744-1748.



- Karlin A, Akabas MH (1995) Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15:1231-1244.
- Kato A, Ozawa F, Saitoh Y, Fukazawa Y, Sugiyama H, Inokuchi K (1998) Novel members of the Ves1/Homer family of PDZ proteins that bind metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 273:23969-23975.
- Katz B, Miledi R (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J Physiol* 192:407-436.
- Kemp JW, Woodbury DM (1965) Synthesis of urea-cycle intermediates from citrulline in brain. *Biochim Biophys Acta* 111:23-31.
- Kew JN, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179:4-29.
- Kew JN, Koester A, Moreau JL, Jenck F, Ouagazzal AM, Mutel V, Richards JG, Trube G, Fischer G, Montkowski A, Hundt W, Reinscheid RK, Pauly-Evers M, Kemp JA, Bluethmann H (2000) Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site. *J Neurosci* 20:4037-4049.
- Khakh BS, Zhou X, Sydes J, Galligan JJ, Lester HA (2000) State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature* 406:405-410.
- King SM, Barbarese E, Dillman JF, III, Patel-King RS, Carson JH, Pfister KK (1996) Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *J Biol Chem* 271:19358-19366.
- Kitano J, Kimura K, Yamazaki Y, Soda T, Shigemoto R, Nakajima Y, Nakanishi S (2002) Tamalin, a PDZ domain-containing protein, links a protein complex formation of group 1 metabotropic glutamate receptors and the guanine nucleotide exchange factor cytohesins. *J Neurosci* 22:1280-1289.
- Knopfel T, Grandes P (2002) Metabotropic glutamate receptors in the cerebellum with a focus on their function in Purkinje cells. *Cerebellum* 1:19-26.
- Kobzik L, Reid MB, Brecht DS, Stamler JS (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372:546-548.
- Koizumi S, Fujishita K (2007) [Gliotransmitter ATP-mediated cell-to-cell communication]. *Brain Nerve* 59:707-715.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Krupnick JG, Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319.
- Kubo M, Ito E (2004) Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Proteins* 56:411-419.
- Kugler P, Schmitt A (1999) Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27:129-142.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407:971-977.

- Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12:1291-1300.
- Kusner LL, Kaminski HJ (1996) Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res* 730:238-242.
- Lai KO, Ip NY (2003) Postsynaptic signaling of new players at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32:727-741.
- Lam HH, Hanley DF, Trapp BD, Saito S, Raja S, Dawson TM, Yamaguchi H (1996) Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neurosci Lett* 210:201-204.
- Lamboleze B, Curutchet P, Stinnakre J, Bregestovski P, Rossier J, Prado de Carvalho L (1991) Electrophysiological and pharmacological properties of GluR1, a subunit of a glutamate receptor-channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 123:69-72.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.
- Leao RM, Von Gersdorff H (2002) Noradrenaline increases high-frequency firing at the calyx of held synapse during development by inhibiting glutamate release. *J Neurophysiol* 87:2297-2306.
- Li JL, Fujiyama F, Kaneko T, Mizuno N (2003a) Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *J Comp Neurol* 457:236-249.
- Li N, Sul JY, Haydon PG (2003b) A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J Neurosci* 23:10302-10310.
- Liley AW, North KA (1953) An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 16:509-527.
- Lin JW, Sugimori M, Llinas RR, McGuinness TL, Greengard P (1990) Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8257-8261.
- Lincoln TM, Cornwell TL (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *Faseb J* 7:328-338.
- Linden DJ (1996) A protein synthesis-dependent late phase of cerebellar long-term depression. *Neuron* 17:483-490.
- Lindgren CA, Laird MV (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Neuroreport* 5:2205-2208.
- Lindstrom JM (2003) Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N Y Acad Sci* 998:41-52.
- Linial M, Ilouz N, Parnas H (1997) Voltage-dependent interaction between the muscarinic ACh receptor and proteins of the exocytic machinery. *J Physiol* 504 ( Pt 2):251-258.

- Liou HC, Yang RS, Fu WM (1996) Potentiation of spontaneous acetylcholine release from motor nerve terminals by glutamate in *Xenopus* tadpoles. *Neuroscience* 75:325-331.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632.
- Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, Moncada S (1996) Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 314 (Pt 3):877-880.
- Llinas RR (1982) Calcium in synaptic transmission. *Sci Am* 247:56-65.
- Logan WJ, Snyder SH (1972) High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res* 42:413-431.
- Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW (1993) Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 268:1908-1913.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9730-9734.
- Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29:243-254.
- Lumme A, Vanhatalo S, Sadeniemi M, Soinila S (1997) Expression of nitric oxide synthase in hypothalamic nuclei following axonal injury or colchicine treatment. *Exp Neurol* 144:248-257.
- Madden KS, van der Kloot W (1982) At the frog neuromuscular junction prostaglandin synthase inhibitors depress and PGE partially restores quantal acetylcholine release. *Brain Res* 234:464-468.
- Maki R, Robinson MB, Dichter MA (1994) The glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate depresses excitatory synaptic transmission via a presynaptic mechanism in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 14:6754-6762.
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340:554-557.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Malomouzh AI, Mukhtarov MR, Nikolsky EE, Vyskocil F, Lieberman EM, Urazaev AK (2003) Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction. *J Neurochem* 85:206-213.
- Mani K, Cheng F, Havsmark B, David S, Fransson LA (2004) Involvement of glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin in the copper/zinc-nitric

- oxide-dependent degradation of glypican-1 heparan sulfate in rat C6 glioma cells. *J Biol Chem* 279:12918-12923.
- Manivet P, Mouillet-Richard S, Callebert J, Nebigil CG, Maroteaux L, Hosoda S, Kellermann O, Launay JM (2000) PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J Biol Chem* 275:9324-9331.
- Martineau M, Baux G, Mothet JP (2006) Gliotransmission at central glutamatergic synapses: D-serine on stage. *J Physiol Paris* 99:103-110.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-1358.
- Matsuda S, Launey T, Mikawa S, Hirai H (2000) Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *Embo J* 19:2765-2774.
- Matteoli M, Torri-Tarelli F, Haimann C (1988) [Coexistence of acetylcholine and calcitonin gene-related peptides at the frog neuromuscular junction: a model for the study of differential secretion of classical neurotransmitters and peptides]. *Ann Ist Super Sanita* 24:527-530.
- Matteoli M, Haimann C, De Camilli P (1990) Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 37:271-275.
- Matyash V, Filippov V, Mohrhagen K, Kettenmann H (2001) Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol Cell Neurosci* 18:664-670.
- McCool BA, Pin JP, Brust PF, Harpold MM, Lovinger DM (1996) Functional coupling of rat group II metabotropic glutamate receptors to an omega-conotoxin GVIA-sensitive calcium channel in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 50:912-922.
- Medina JH, Izquierdo I (1995) Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 21:185-194.
- Meffert MK, Premack BA, Schulman H (1994) Nitric oxide stimulates  $\text{Ca}^{2+}$ -independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12:1235-1244.
- Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H (1996) Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron* 16:1229-1236.
- Mentis GZ, Alvarez FJ, Bonnot A, Richards DS, Gonzalez-Forero D, Zerda R, O'Donovan MJ (2005) Noncholinergic excitatory actions of motoneurons in the neonatal mammalian spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7344-7349.
- Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* 6:925-932.
- Miledi R, Parker I, Zhu PH (1984) Extracellular ions and excitation-contraction coupling in frog twitch muscle fibres. *J Physiol* 351:687-710.
- Miller WH (1982) Physiological evidence that light-mediated decrease in cyclic GMP is an intermediary process in retinal rod transduction. *J Gen Physiol* 80:103-123.
- Mitrovic B, Ignarro LJ, Montestrucque S, Smoll A, Merrill JE (1994) Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cells in vitro. *Neuroscience* 61:575-585.

- Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012.
- Moncada S, Bolanos JP (2006) Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* 97:1676-1689.
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 24:2633-2642.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Murphy S (2000) Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29:1-13.
- Murthy VN, De Camilli P (2003) Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 26:701-728.
- Murthy VN, Sejnowski TJ, Stevens CF (1997) Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 18:599-612.
- Nadim F, Manor Y, Kopell N, Marder E (1999) Synaptic depression creates a switch that controls the frequency of an oscillatory circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8206-8211.
- Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem* 268:11868-11873.
- Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 180:1396-1402.
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316:175-180.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Nakatsubo N, Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Akaike T, Maeda H, Urano Y, Higuchi T, Nagano T (1998) Improved nitric oxide detection using 2,3-diaminonaphthalene and its application to the evaluation of novel nitric oxide synthase inhibitors. *Biol Pharm Bull* 21:1247-1250.
- Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.
- Neher E, Marty A (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:6712-6716.
- Neugebauer V (2001) Peripheral metabotropic glutamate receptors: fight the pain where it hurts. *Trends Neurosci* 24:550-552.
- Neugebauer V (2002) Metabotropic glutamate receptors--important modulators of nociception and pain behavior. *Pain* 98:1-8.

- Newman EA (2001) Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci* 21:2215-2223.
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18:4022-4028.
- Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11:462-468.
- Nickels TJ, Reed GW, Drummond JT, Blevins DE, Lutz MC, Wilson DF (2007) Does nitric oxide modulate transmitter release at the Mammalian neuromuscular junction? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:318-326.
- Nicoletti F, Meek JL, Iadarola MJ, Chuang DM, Roth BL, Costa E (1986) Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus. *J Neurochem* 46:40-46.
- Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
- Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC (1988) The current excitement in long-term potentiation. *Neuron* 1:97-103.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- Nikitovic D, Holmgren A (1996) S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem* 271:19180-19185.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5245-5249.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161:303-310.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11285-11289.
- Ogata T (1988) Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. *Arch Histol Cytol* 51:385-424.
- Oh S, Yun BS, Ryoo IJ, McCaslin PP, Yoo ID (1999) Nitric oxide synthase inhibitor decreases NMDA-induced elevations of extracellular glutamate and intracellular  $Ca^{2+}$  levels via a cGMP-independent mechanism in cerebellar granule neurons. *Arch Pharm Res* 22:48-54.
- Okada D (1992) Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J Neurochem* 59:1203-1210.
- Otani S, Ben-Ari Y (1991) Metabotropic receptor-mediated long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 205:325-326.

- Otis T, Zhang S, Trussell LO (1996) Direct measurement of AMPA receptor desensitization induced by glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 16:7496-7504.
- Palacios-Callender M, Quintero M, Hollis VS, Springett RJ, Moncada S (2004) Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7630-7635.
- Pappas D HL, Robitaille R (1995) Arachidonic acid and PGE2 as possible glial modulators of synaptic activity at the frog neuromuscular junction. In: *Society for Neuroscience*.
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD (2004) Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305:1972-1975.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:917-926.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17:7817-7830.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci* 21:477-484.
- Patton BL (2003) Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *J Neurocytol* 32:883-903.
- Peavy RD, Conn PJ (1998) Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat cortical glia by stimulation of metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* 71:603-612.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Personius KE, Balice-Gordon RJ (2002) Activity-dependent synaptic plasticity: insights from neuromuscular junctions. *Neuroscientist* 8:414-422.
- Peters O, Schipke CG, Hashimoto Y, Kettenmann H (2003) Different mechanisms promote astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves and spreading depression in the mouse neocortex. *J Neurosci* 23:9888-9896.
- Pilz RB, Broderick KE (2005) Role of cyclic GMP in gene regulation. *Front Biosci* 10:1239-1268.
- Pin JP, Joly C, Heinemann SF, Bockaert J (1994) Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C-coupled metabotropic glutamate receptors. *Embo J* 13:342-348.
- Pinard A, Levesque S, Vallee J, Robitaille R (2003) Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur J Neurosci* 18:3241-3250.

- Pineda J, Kogan JH, Aghajanian GK (1996) Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J Neurosci* 16:1389-1399.
- Pinheiro P, Mulle C (2006) Kainate receptors. *Cell Tissue Res* 326:457-482.
- Pizarro G, Csernoch L, Uribe I, Rodriguez M, Rios E (1991) The relationship between Q gamma and Ca release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *J Gen Physiol* 97:913-947.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073-5081.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Prast H, Philippu A (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 64:51-68.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM (1996) Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4565-4571.
- Pyriochou A, Papapetropoulos A (2005) Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal* 17:407-413.
- Ramaharobandro N, Borg J, Mandel P, Mark J (1982) Glutamine and glutamate transport in cultured neuronal and glial cells. *Brain Res* 244:113-121.
- Rathouz MM, Berg DK (1994) Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J Neurosci* 14:6935-6945.
- Reis-Santos K, Ferreira J, Aguiar C, Timoteo AT, Ribeiro MA, Seabra-Gomes R (2002) Influence of prior medication on mode of presentation and prognosis of acute coronary syndromes. *Rev Port Cardiol* 21:317-326.
- Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL (1997) Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J Appl Physiol* 82:1250-1255.
- Reist NE, Smith SJ (1992) Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7625-7629.
- Ribera J, Marsal J, Casanovas A, Hukkanen M, Tarabal O, Esquerda JE (1998) Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 51:90-102.
- Rich MM (2006) The control of neuromuscular transmission in health and disease. *Neuroscientist* 12:134-142.
- Rinholm JE, Slettalokken G, Marcaggi P, Skare O, Storm-Mathisen J, Bergersen LH (2007a) Subcellular localization of the glutamate transporters GLAST and GLT at the neuromuscular junction in rodents. *Neuroscience* 145:579-591.
- Rinholm JE, Slettalokken G, Marcaggi P, Skare O, Storm-Mathisen J, Bergersen LH (2007b) Subcellular localization of the glutamate transporters glast and GLT at the neuromuscular junction in rodents. *Neuroscience*.
- Rios E, Brum G (1987) Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325:717-720.



- Robitaille R (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15:7121-7131.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847-855.
- Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5:773-779.
- Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997) Muscarinic  $Ca^{2+}$  responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 504 ( Pt 2):337-347.
- Rochon D, Rousse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:3819-3829.
- Rodriguez-Crespo I, Straub W, Gavilanes F, Ortiz de Montellano PR (1998) Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Arch Biochem Biophys* 359:297-304.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.
- Rothe T, Bigl V, Grantyn R (1994) Potentiating and depressant effects of metabotropic glutamate receptor agonists on high-voltage-activated calcium currents in cultured retinal ganglion neurons from postnatal mice. *Pflügers Arch* 426:161-170.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Ruff RL (1998) Electrophysiology of postsynaptic activation. *Ann N Y Acad Sci* 841:57-70.
- Rusakov DA, Fine A (2003) Extracellular  $Ca^{2+}$  depletion contributes to fast activity-dependent modulation of synaptic transmission in the brain. *Neuron* 37:287-297.
- Rush AM, Kilbride J, Rowan MJ, Anwyl R (2002) Presynaptic group III mGluR modulation of short-term plasticity in the lateral perforant path of the dentate gyrus in vitro. *Brain Res* 952:38-43.
- Sadasivudu B, Rao TI (1976) Studies on functional and metabolic role of urea cycle intermediates in brain. *J Neurochem* 27:785-794.
- Sahara Y, Westbrook GL (1993) Modulation of calcium currents by a metabotropic glutamate receptor involves fast and slow kinetic components in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 13:3041-3050.
- Saier MH, Jr. (1999) Eukaryotic transmembrane solute transport systems. *Int Rev Cytol* 190:61-136.
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.
- Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA

- receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* 87:2052-2063.
- Sayer RJ, Schwindt PC, Crill WE (1992) Metabotropic glutamate receptor-mediated suppression of L-type calcium current in acutely isolated neocortical neurons. *J Neurophysiol* 68:833-842.
- Scemes E, Giaume C (2006) Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54:716-725.
- Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 277:50734-50748.
- Schiffer HH, Swanson GT, Heinemann SF (1997) Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron* 19:1141-1146.
- Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17:5858-5867.
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H (2002) Astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *Faseb J* 16:255-257.
- Schoepp DD, Jane DE, Monn JA (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38:1431-1476.
- Schousboe A, Hertz L, Svenneby G, Kvamme E (1979) Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes. *J Neurochem* 32:943-950.
- Schuman EM, Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254:1503-1506.
- Schuske KR, Richmond JE, Matthies DS, Davis WS, Runz S, Rube DA, van der Bliek AM, Jorgensen EM (2003) Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptotagmin. *Neuron* 40:749-762.
- Schweighofer N, Ferriol G (2000) Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: A simulation study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10661-10665.
- Seagar M, Leveque C, Charvin N, Marqueze B, Martin-Moutot N, Boudier JA, Boudier JL, Shoji-Kasai Y, Sato K, Takahashi M (1999) Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:289-297.
- Seal RP, Leighton BH, Amara SG (2000) A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 25:695-706.
- Segev I (1990) Computer study of presynaptic inhibition controlling the spread of action potentials into axonal terminals. *J Neurophysiol* 63:987-998.
- Sharma HS, Westman J, Alm P, Sjoquist PO, Cervos-Navarro J, Nyberg F (1997) Involvement of nitric oxide in the pathophysiology of acute heat stress in the rat. Influence of a new antioxidant compound H-290/51. *Ann N Y Acad Sci* 813:581-590.

- Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T (1996) Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271:6518-6522.
- Sheng M, Sala C (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24:1-29.
- Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105:331-343.
- Shibuki K, Okada D (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349:326-328.
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45:250-265.
- Siderovski DP, Strockbine B, Behe CI (1999) Whither goest the RGS proteins? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34:215-251.
- Silinsky EM (1984) On the mechanism by which adenosine receptor activation inhibits the release of acetylcholine from motor nerve endings. *J Physiol* 346:243-256.
- Silvagno F, Xia H, Bredt DS (1996) Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 271:11204-11208.
- Simpson PB, Challiss RA, Nahorski SR (1995) Neuronal Ca<sup>2+</sup> stores: activation and function. *Trends Neurosci* 18:299-306.
- Sliskovic I, Raturi A, Mutus B (2005) Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 280:8733-8741.
- Smith DO (1991) Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. *J Physiol* 432:343-354.
- Smith TC, Wang LY, Howe JR (2000) Heterogeneous conductance levels of native AMPA receptors. *J Neurosci* 20:2073-2085.
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-19.
- Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *Embo J* 11:1651-1656.
- Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249:1580-1585.
- Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 19:280-285.
- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275:73-77.
- Sossin WS, Fisher JM, Scheller RH (1989) Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. *Neuron* 2:1407-1417.

- Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S (2003) Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol* 551:927-943.
- Southan GJ, Szabo C (1996) Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* 51:383-394.
- Spessert R, Layes E, Schollmayer A, Reuss S, Vollrath L (1995) In the rat pineal gland, but not in the suprachiasmatic nucleus, the amount of constitutive neuronal nitric oxide synthase is regulated by environmental lighting conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 212:70-76.
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106:675-683.
- Stefani A, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G, Calabresi P (1994) Activation of metabotropic glutamate receptors inhibits calcium currents and GABA-mediated synaptic potentials in striatal neurons. *J Neurosci* 14:6734-6743.
- Stevens CF, Wang Y (1994) Changes in reliability of synaptic function as a mechanism for plasticity. *Nature* 371:704-707.
- Stuehr DJ, Marletta MA (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7738-7742.
- Sudhof TC (2000) The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28:317-320.
- Swanson GT, Green T, Heinemann SF (1998) Kainate receptors exhibit differential sensitivities to (S)-5-iodowillardiine. *Mol Pharmacol* 53:942-949.
- Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, Cull-Candy SG (1996) Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J Physiol* 492 ( Pt 1):129-142.
- Swartz KJ (1993) Modulation of  $Ca^{2+}$  channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron* 11:305-320.
- Swartz KJ, Bean BP (1992) Inhibition of calcium channels in rat CA3 pyramidal neurons by a metabotropic glutamate receptor. *J Neurosci* 12:4358-4371.
- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* 274:594-597.
- Takamori S (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res* 55:343-351.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Tapia R (1996) Release and uptake of glutamate as related to excitotoxicity. *Rev Bras Biol* 56 Su 1 Pt 1:165-174.
- Tascedda F, Molteni R, Racagni G, Riva MA (1996) Acute and chronic changes in  $K^{+}$ -induced depolarization alter NMDA and nNOS gene expression in cultured cerebellar granule cells. *Brain Res Mol Brain Res* 40:171-174.

- Tatton WG, Olanow CW (1999) Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1410:195-213.
- Teubner B, Degen J, Sohl G, Guldenagel M, Bukauskas FF, Trexler EB, Verselis VK, De Zeeuw CI, Lee CG, Kozak CA, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, Willecke K (2000) Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J Membr Biol* 176:249-262.
- Thomas S, Robitaille R (2001) Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21:1087-1095.
- Thompson CM, Bernhard AE, Strobel HW (1997) Barbiturate-induced expression of neuronal nitric oxide synthase in the rat cerebellum. *Brain Res* 754:142-146.
- Tiegs OW (1953) Innervation of voluntary muscle. *Physiol Rev* 33:90-144.
- Todd KJ, Robitaille R (2006) Purinergic modulation of synaptic signalling at the neuromuscular junction. *Pflugers Arch* 452:608-614.
- Todd KJ, Slatter CA, Ali DW (2004) Activation of ionotropic glutamate receptors on peripheral axons of primary motoneurons mediates transmitter release at the zebrafish NMJ. *J Neurophysiol* 91:828-840.
- Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature* 379:174-177.
- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19:328-334.
- Trudeau LE (2004) Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *J Psychiatry Neurosci* 29:296-310.
- Trussell LO, Zhang S, Raman IM (1993) Desensitization of AMPA receptors upon multiquantal neurotransmitter release. *Neuron* 10:1185-1196.
- Tsuchiya D, Kunishima N, Kamiya N, Jingami H, Morikawa K (2002) Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd<sup>3+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2660-2665.
- Turecek R, Trussell LO (2000) Control of synaptic depression by glutamate transporters. *J Neurosci* 20:2054-2063.
- Urazaev AK, Magsumov ST, Poletayev GI, Nikolsky EE, Vyskocil F (1995) Muscle NMDA receptors regulate the resting membrane potential through NO-synthase. *Physiol Res* 44:205-208.
- Van der Kloot W, Molgo J (1994) Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* 74:899-991.
- Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC (1997) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem* 272:28187-28190.
- Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252:1715-1718.

- Verkhatsky A, Kettenmann H (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci* 19:346-352.
- Vernino S, Rogers M, Radcliffe KA, Dani JA (1994) Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 14:5514-5524.
- Verstreken P, Koh TW, Schulze KL, Zhai RG, Hiesinger PR, Zhou Y, Mehta SQ, Cao Y, Roos J, Bellen HJ (2003) Synaptojanin is recruited by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron* 40:733-748.
- Vijayaraghavan S, Pugh PC, Zhang ZW, Rathouz MM, Berg DK (1992) Nicotinic receptors that bind alpha-bungarotoxin on neurons raise intracellular free  $Ca^{2+}$ . *Neuron* 8:353-362.
- Vinatier J, Herzog E, Plamont MA, Wojcik SM, Schmidt A, Brose N, Daviet L, El Mestikawy S, Giros B (2006) Interaction between the vesicular glutamate transporter type 1 and endophilin A1, a protein essential for endocytosis. *J Neurochem* 97:1111-1125.
- Voglmaier SM, Edwards RH (2007) Do different endocytic pathways make different synaptic vesicles? *Curr Opin Neurobiol* 17:374-380.
- Voglmaier SM, Kam K, Yang H, Fortin DL, Hua Z, Nicoll RA, Edwards RH (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron* 51:71-84.
- Vyas S, Bradford HF (1987) Co-release of acetylcholine, glutamate and taurine from synaptosomes of Torpedo electric organ. *Neurosci Lett* 82:58-64.
- Waerhaug O, Ottersen OP (1993) Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* 188:501-513.
- Wafford KA, Kathoria M, Bain CJ, Marshall G, Le Bourdelles B, Kemp JA, Whiting PJ (1995) Identification of amino acids in the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit that contribute to the glycine binding site. *Mol Pharmacol* 47:374-380.
- Walker K, Reeve A, Bowes M, Winter J, Wotherspoon G, Davis A, Schmid P, Gasparini F, Kuhn R, Urban L (2001) mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology* 40:10-19.
- Wang JQ, Mao LM (1999) Pharmacological regulation of striatal gene expression by metabotropic glutamate receptors. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20:577-584.
- Wang T, Xie Z, Lu B (1995) Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature* 374:262-266.
- Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 68:443-456.
- Wang Y, Newton DC, Marsden PA (1999) Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol* 13:21-43.
- Ward CW, Feng W, Tu J, Pessah IN, Worley PK, Schneider MF (2004) Homer protein increases activation of  $Ca^{2+}$  sparks in permeabilized skeletal muscle. *J Biol Chem* 279:5781-5787.
- Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21:165-204.

- Westergaard N, Beart PM, Schousboe A (1993) Transport of L-[3H]arginine in cultured neurons: characteristics and inhibition by nitric oxide synthase inhibitors. *J Neurochem* 61:364-367.
- Wiesinger H (2001) Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 64:365-391.
- Wilcox CS, Welch WJ (1998) Macula densa nitric oxide synthase: expression, regulation, and function. *Kidney Int Suppl* 67:S53-57.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383:725-737.
- Willmott NJ, Wong K, Strong AJ (2000) A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca(2+) waves in glia. *J Neurosci* 20:1767-1779.
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588-592.
- Wood J, Garthwaite J (1994) Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 33:1235-1244.
- Woody CD, Bartfai T, Gruen E, Nairn AC (1986) Intracellular injection of cGMP-dependent protein kinase results in increased input resistance in neurons of the mammalian motor cortex. *Brain Res* 386:379-385.
- Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20:204-212.
- Wu LG, Borst JG (1999) The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron* 23:821-832.
- Xia Y, Zweier JL (1997) Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6954-6958.
- Xie QW, Whisnant R, Nathan C (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177:1779-1784.
- Xu-Friedman MA, Harris KM, Regehr WG (2001) Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21:6666-6672.
- Yamada K, Nabeshima T (1998) Modulation of nitric oxide production in vivo in the brain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 20:601-605.
- Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Tanaka K, Wada K, Inoue Y (1996) EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport* 7:2013-2017.
- Yamada K, Senzaki K, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, Nabeshima T (1997) Changes in extracellular nitrite and nitrate levels after inhibition of glial metabolism with fluorocitrate. *Brain Res* 762:72-78.
- Yamakura T, Shimoji K (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59:279-298.
- Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Haun CK, Askanas V (1997) Immunolocalization of nitric oxide synthases at the postsynaptic domain of

- human and rat neuromuscular junctions--light and electron microscopic studies. *Exp Neurol* 148:34-44.
- Yuan T, Vogel HJ, Sutherland C, Walsh MP (1998) Characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$  -dependent and -independent interactions between calmodulin and its binding domain of inducible nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 431:210-214.
- Yuan T, Walsh MP, Sutherland C, Fabian H, Vogel HJ (1999) Calcium-dependent and -independent interactions of the calmodulin-binding domain of cyclic nucleotide phosphodiesterase with calmodulin. *Biochemistry* 38:1446-1455.
- Yudkoff M, Zaleska MM, Nissim I, Nelson D, Erecinska M (1989) Neuronal glutamine utilization: pathways of nitrogen transfer studied with  $[^{15}\text{N}]$ glutamine. *J Neurochem* 53:632-640.
- Zampighi G, Vergara J, Ramon F (1975) On the connection between the transverse tubules and the plasma membrane in frog semitendinosus skeletal muscle. Are caveolae the mouths of the transverse tubule system? *J Cell Biol* 64:734-740.
- Zerangue N, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP (1995) Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J Biol Chem* 270:6433-6435.
- Zhang S, Trussell LO (1994) Voltage clamp analysis of excitatory synaptic transmission in the avian nucleus magnocellularis. *J Physiol* 480 ( Pt 1):123-136.
- Zhang ZG, Reif D, Macdonald J, Tang WX, Kamp DK, Gentile RJ, Shakespeare WC, Murray RJ, Chopp M (1996) ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:599-604.
- Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* 368:635-639.
- Zilberter Y (2000) Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J Physiol* 528:489-496.
- Zilberter Y, Kaiser KM, Sakmann B (1999) Dendritic GABA release depresses excitatory transmission between layer 2/3 pyramidal and bitufted neurons in rat neocortex. *Neuron* 24:979-988.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.
- Zylinska L, Kawecka I, Lachowicz L, Szemraj J (2002) The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump. *Cell Mol Biol Lett* 7:1037-1045.



## **Annexes**

## **Droits d'auteurs**